

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMACIA

Departament de Ciéncies Fisiològiques, Humanes
i de la Nutrició

"HISTAMINA Y TIRAMINA EN PESCADOS Y DERIVADOS:
CONTENIDOS Y RELACION CON EL DETERIORO"

Memoria presentada por
Dña. Teresa Veciana Nogués
para optar al grado de
Licenciatura.

Directores:

- Abel Mariné Font
- M. C. Vidal Carou

Barcelona, Septiembre 1988

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701739259



UNIVERSITAT DE BARCELONA
DIVISIÓ DE CIÈNCIES DE LA SALUT

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES FISIOLÒGIQUES
HUMANES I DE LA NUTRICIÓ
NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

ABEL MARINE I FONT, Catedràtic de Nutrició i
Bromatologia:

Faig constar que la Tesina que porta per títol
"Histamina y tiramina en pescados y derivados:
Contenidos y relación con el deterioro", de
la qual en sóc director conjuntament amb la
Dra. M.CARMEN VIDAL CAROU, presentada per
na Teresa Veciana i Nogués per optar al Grau
de Llicenciat, ha superat, segons el nostre
criteri tots els requisits pertinents, per la
qual cosa pot ésser jutjada.

Barcelona, a 30 de Setembre de 1988

Abel Mariné i Font

El trabajo expuesto en esta memoria se integra dentro de un proyecto más amplio que cuenta con una subvención de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT).

Desitjo expressar el meu agraïment :

A la Dra M^a Carmen Vidal Carou per la seva amistat i la dedicació i l'interès amb que a tota hora ha estat prop meu.

A Dr. Abel Mariné per haber-me donat la oportunitat de realitzar aquesta tesina y per els seus consells i direcció.

Als companys del Departament i a vosaltres, amics d'amines, que sempre m'heu ajudat fent que aquest treball fos , a més a més, una cosa agradable.

- als meus pares

- al Fernando

I. PARTE BIBLIOGRAFICA	Página
1. INTRODUCCION	1
2. COMPOSICION Y ESTRUCTURA DEL MUSCULO DE PESCADO CAMBIOS "POST-MORTEM"	4
3. PARAMETROS PARA EVALUAR LA FRESCURA DEL PESCADO ...	19
3.1 RELACIONADOS CON COMPUESTOS NITROGENADOS	19
3.1.1 BASES VOLATILES TOTALES	20
3.1.2 TRIMETILAMINA	22
3.1.3 DIMETILAMINA Y FORMALDEHIDO	23
3.1.4 AMINAS NO VOLATILES: HISTAMINA Y TIRAMINA	24
3.2 RELACIONADOS CON LA DEGRADACION DE COMPUES- TOS FOSFORADOS	25
3.2.1 HIPOXANTINA	26
3.2.2 INDICE K	27
3.3 OTROS PARAMETROS	28
3.3.1 DETERMINACION DEL pH	28
3.3.2 SUSTANCIAS VOLATILES REDUCTORAS	29
3.3.3 ACIDO 2-TIOBARBITURICO	29
3.3.4 INDICE DE PEROXIDOS	30
3.4 LEGISLACION ESPANOLA EN RELACION CON LA FRESCURA DEL PESCADO	31
4. AMINAS BIOGENAS EN PESCADOS	34
4.1 ORIGEN Y FORMACION	34
4.1.1 DISPONIBILIDAD DE AMINOACIDOS PRECUR- SORES LIBRES	34
4.1.2 FORMACION DE AMINAS BIOGENAS POR ACTIVIDAD BACTERIANA	35
4.2 CONTENIDOS	42
4.3 INTERES TECNOLOGICO DE LAS AMINAS BIOGENAS	46
4.4 INTERES TOXICOLOGICO	49
4.4.1 INTOXICACIONES HISTAMINICAS	50
4.4.2 MIGRAÑAS DE ORIGEN ALIMENTARIO	53
4.4.3 INTERACCIONES CON MEDICAMENTOS IMAO	57

	Página
II. 5 OBJETIVOS Y ETAPAS DE TRABAJO	60
III. PARTE EXPERIMENTAL	
6. METODOS EMPLEADOS	61
6.1 DETERMINACION DE HISTAMINA	61
6.1.1 INSTRUMENTACION Y REACTIVOS	62
6.1.2 DESCRIPCION DEL METODO	63
6.1.3 VALIDEZ DEL METODO	71
6.1.3.1 Precision	71
6.1.3.2. Recuperacion.....	72
6.2 DETERMINACION DE TIRAMINA	74
6.2.1 INSTRUMENTACION Y REACTIVOS	75
6.2.2 DESCRIPCION DEL METODO	76
6.2.3 VALIDEZ DEN METODO	79
6.2.3.1 Recuperación	79
6.3 DETERMINACION DE TRIMETILAMINA	88
6.3.1 INSTRUMENTACION Y REACTIVOS	89
6.3.2 DESCRIPCION DEL METODO	90
6.4 DETERMINACION DE BASES VOLATILES TOTALES	93
6.4.1 INSTRUMENTACION Y REACTIVOS	93
6.4.2 DESCRIPCION DEL METODO	94
6.5 DETERMINACION DE LA HIPOXANTINA	96
6.5.1 INSTRUMENTACION Y REACTIVOS	96
6.5.2 DESCRIPCION DEL METODO	97
6.6 DETERMINACION DE pH	101
6.6.1 INSTRUMENTACION	101
6.6.2 DESCRIPCION DEL METODO	101

7. EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE HISTAMINA Y TIRAMINA EN PESCADOS (BOQUERONES) DURANTE SU DETERIORO Y OTROS PARAMETROS INDICADORES DE ESTE PROCESO	102
7.1 PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	102
7.2 RESULTADOS	103
7.3 DISCUSION	105
8. CONTENIDOS DE HISTAMINA Y TIRAMINA EN CONSERVAS DE PESCADO	122
8.1 MUESTRAS ESTUDIADAS	122
8.2 RESULTADOS	122
8.3 DICUSION	129
9. CONTENIDOS DE HISTAMINA Y TIRAMINA EN SEMICONSERVAS DE ANCHOA A LO LARGO DE SU PERIODO DE CONSERVACION	139
9.1 PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y MUESTRAS ESTUDIADAS	139
9.2 RESULTADOS	140
9.3 DISCUSION	141
10. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES	143
IV. BIBLIOGRAFIA	146

I PARTE BIBLIOGRAFICA

1.-INTRODUCCION

El pescado es un producto que debido a sus peculiares características de estructura y composición se deteriora con gran facilidad. Los microorganismos, responsables de este deterioro pueden tener capacidad aminoácido descarboxilásica y originar aminas biógenas a partir de sus aminoácidos precursores.

En pescados en general, se considera indeseable la presencia de contenidos elevados de aminas biógenas, ya que serían una consecuencia más de la actividad microbiana responsable del deterioro de los mismos. Sin embargo, en otros alimentos cuya elaboración implica procesos de fermentación y/o maduración (quesos, vinos, embutidos curados...) la situación es distinta ya que si bien pueden formarse aminas biógenas durante estos procesos, en estos casos concretos la actividad bacteriana responsable es deseada y necesaria para que el alimento adquiera unas determinadas características.

No obstante, esta diferencia no es siempre fácil de establecer ya que también es posible que la formación de aminas, al menos en parte, sea debida a contaminaciones microbianas indeseadas durante la elaboración de estos productos fermentados y/o madurados. En este caso será necesario distinguir si la formación de aminas es debida a la flora fermentativa o a la flora contaminante. Esta cuestión no se encuentra resuelta en la actualidad y sigue siendo motivo de numerosos estudios.

Las aminas biógenas presentan por otra parte interés toxicológico, ya que pueden dar lugar a :

- a) intoxicaciones histamínicas
- b) migrañas de origen alimentario
- c) interacciones con medicamentos inhibidores del enzima mono-amino oxidasa.

a) el consumo de alimentos con elevados contenidos de aminas biógenas puede representar un riesgo toxicológico. De hecho, se han descrito ya numerosos casos de intoxicaciones alimentarias atribuibles a niveles elevados de histamina ("Intoxicaciones histamínicas", también llamadas "falsas alergias alimentarias" o "envenenamiento por escómbridos"). La participación de otras aminas biógenas, y entre éstas la tiramina, en este tipo de intoxicaciones es una cuestión que parece demostrada.

b) un porcentaje importante de las migrañas de origen alimentario se atribuyen al consumo de alimentos con niveles importantes de tiramina. También en este caso actuarían de modo sinérgico otras aminas.

c) la existencia de interacciones entre medicamentos IMAO y aminas biógenas tiene como consecuencia la potenciación de los efectos tóxicos de las aminas, ya que se encuentra inhibido el sistema enzimático responsable de su metabolización. Este tipo de interacciones, es conocido desde la década de los años 70 y ha sido responsable, en parte, de la retirada del mercado de un número importante de fármacos IMAO, sustituyéndolos por otros de actividad terapéutica similar pero sin este efecto secundario.

Otro aspecto importante que justifica el estudio de las aminas biógenas radica en su posible interés tecnológico, por cuanto que podrían ser útiles como parámetros indicadores del estado sanitario de los productos en que se originan, ya que como se ha citado con anterioridad, su origen es fundamentalmente debido a la actividad descarboxilásica de la flora bacteriana.

Concretamente en pescado, este eventual papel ha sido y sigue siendo, un tema a estudiar ya que los resultados obtenidos hasta el momento son parciales y ofrecen conclusiones a veces contradictorias.

El "grado de frescura" se ha evaluado tradicionalmente mediante un examen organoléptico y sólo en algunos casos se recurre a la determinación de compuestos volátiles que se forman durante su descomposición. Si bien estas determinaciones pueden ser suficientes para evaluar el estado de los "pescados frescos", resultan inadecuadas en el caso de conservas de pescado, ya que durante su procesamiento han sido sometidas a tratamientos térmicos y como consecuencia disminuyen e incluso desaparecen los compuestos volátiles, al mismo tiempo que se destruye la eventual flora microbiana presente.

Las aminas biógenas, por el contrario, tienen carácter fijo (no volátil), resisten los tratamientos térmicos y por tanto se encontrarán presentes en el producto final. Así la existencia de niveles elevados de aminas biógenas en conservas de pescado sería consecuencia de un desarrollo microbiano indeseable de la materia o de contaminaciones bacterianas durante el procesamiento, por lo tanto, podrían ser, en definitiva, indicadores de la "calidad sanitaria" de estos alimentos, al mismo tiempo que se destruye la eventual flora microbiana presente.

Nuestro trabajo pretende contribuir al estudio de la validez del empleo de las aminos biógenas, concretamente de histamina y de tiramina como parámetros indicadores del estado higienico-sanitario del pescado (en nuestro caso boquerón, Engraulis encrasicolus) mediante ensayos que nos permitan decidir si existe una correlación entre la formación de estas aminos y la degradación de estos productos, estableciendo además una comparación con el comportamiento de otros parámetros clásicamente utilizados para evaluar la frescura del pescado.

Igualmente pretendemos obtener información acerca de los contenidos de aminos biógenas en conservas y semiconservas de pescado disponibles en nuestro mercado a fin de comparar los datos obtenidos con los aportados por otros autores en los diferentes países. Y de evaluar su posible trascendencia toxicológica.

2.- COMPOSICION Y ESTRUCTURA DEL MUSCULO DE PESCADO .

CAMBIOS "POST-MORTEM"

COMPOSICION (BERLITZ, 1988; HARTHORN, 1983; JACQUOT, 1961)

La carne de pescado prácticamente sólo contiene glucógeno. A diferencia de los animales de sangre caliente su tejido conectivo es más laxo y difuso, lo que hace que se digiera con mayor rapidez y también que su degradación sea más rápida.

Mientras que la proporción de proteína bruta del pescado es de un 17 a un 20 por ciento. Los contenidos de grasa y de agua varían dentro de unos amplios límites. Así, es posible clasificar a los peces teleosteos (de esqueleto óseo) según su contenido lipídico:

a) Pescado blanco cilíndrico de plataforma continental, como el bacalao y la merluza, que contienen menos del 1 por ciento de grasa.

b) Pescado blanco de la plataforma continental, que contiene menos del 4 por ciento en grasa (con la excepción del hipogloso, que puede contener hasta un 9 por ciento). Se incluyen en este grupo pescados como la platija y el lenguado.

c) Peces muy grasos o pelágicos, con un contenido en grasa del 16 al 26 por ciento, entre los que se encuentran el arenque, la sardina y el atún.

d) Pescados de agua dulce y de carne roja que contienen hasta un 14 por ciento de grasa, como el salmón.

En la tabla 1 se indican las correspondientes fracciones de agua, proteínas, lípidos e hidratos de carbono de estos pescados.

Tabla 1 Composición básica de algunos pescados (PEARSON, 1986)

Clase o especie pescado	Agua %	Grasa %	Proteína %	Cenizas %
Blanco cilíndrico	78-84	0.1-0.9	15-20	1
Blanco plano.....	78-82	0.5-4.0	15-19	1
Arenque.....	66	7-30	14-24	1
Salmón.....	67	1-14	16-24	1

Las cifras indicadas en la tabla se refieren a contenidos medios, puesto que dentro de una misma especie los porcentajes de agua y de grasa, sobretodo, pueden variar por numerosas causas, entre estas: la estación del año y la disponibilidad de alimento. Así, en peces pelágicos, después del desove la cifra de grasa desciende bruscamente hasta valores próximos al 1 por ciento. A medida que el contenido lipídico desciende, aumenta el contenido hídrico (de mayor densidad) y el pez puede ganar peso al mismo tiempo que "adelgaza"

PROTEINAS

El contenido en Nitrogeno protéico del músculo de pescado representa de un 2 al 3 por ciento. Atendiendo a su composición en aminoácidos, se observa que la proteína de pescado es de alto valor biológico ya que contiene todos los aminoácidos esenciales.

Las proteínas de pescado pueden clasificarse en los siguientes grupos:

- Proteínas del sarcoplasma.
- Proteínas contráctiles.
- Proteínas del tejido conjuntivo.
- Proteínas séricas.

Proteínas del sarcoplasma

Constituyen un 16-22 por ciento de la proteína total. En el "rigor mortis" esta proporción se reduce a la mitad debido a la dilución con agua subsiguiente a la sinéresis de las miofibrillas.

En este grupo de proteínas se incluyen numerosos enzimas que se caracterizan por tener su actividad máxima a bajas temperaturas. Por ello, aunque el pescado se refrigere o se mantenga en hielo después de su captura, mantienen su actividad y esta es importante en relación con los cambios de sabor que sufre el pescado durante su almacenamiento.

La separación mediante electroforésis de las proteínas sarcoplasmáticas revela la presencia de complejos protéicos propios de cada especie que permiten la diferenciación de la misma.

En el grupo de proteínas sarcoplasmáticas también se pueden incluir las proteínas pigmentadas o cromoproteínas (mioglobina, hemoglobina y citocromo). Su contenido es muy variable según la especie, pero en ningún caso es tan elevado como en el músculo de los mamíferos. En especies muy pigmentadas (ej. atún) pueden producirse decoloraciones como consecuencia de los procesos de degradación de estos pigmentos ("verdeado" de las conservas de atún).

Proteínas contráctiles

La fracción de proteínas contráctiles respecto a la de proteína total es mayor en el músculo de pescado que en el de los mamíferos, ya que puede alcanzar hasta un 75 por ciento del total de proteína. Están constituidas por miosina (40 por ciento, que varía de unas especies a otras) y actina (15 al 20 por ciento). El complejo actomiosina es más difícil de separar que en el músculo de los mamíferos. La actina es más rica en grupos -SH y la miosina es más sensible a los enzimas proteolíticos, al calor y a la desecación, que en los animales de sangre caliente. Esta mayor sensibilidad de la miosina junto con el menor contenido en colágeno de la carne de pescado justifica su buena digestibilidad (CHEFTEL y CHEFTEL, 1980).

Así como las proteínas de la fracción sarcoplasmática son las responsables principales de los cambios de sabor durante el almacenamiento, las proteínas miofibrilares (contráctiles), son las causantes de los cambios de textura debido a los cambios que sufren en el periodo "post mortem".

El tejido muscular del pescado, por su particular disposición de fibras no interconectadas en sentido longitudinal, es particularmente sensible a cualquier alteración: cambios de pH, elevación de la temperatura, cambios de concentración salina...

Proteínas del tejido conjuntivo

Constituyen aproximadamente un 3 por ciento del total de proteína en los peces óseos (teleósteos) y llegan al 10 por ciento en los peces cartilagosos (tiburón, raya...). No obstante, en ambos casos su contenido es menor que en el músculo de los mamíferos.

La temperatura de retracción del colágeno del pescado es de unos 45 grados C, bastante inferior a la de los mamíferos (60-65 grados C).

El bajo contenido en colágeno y su temperatura de retracción explica que el músculo de pescado sea más "tierno" que el de mamífero.

Proteínas séricas

Además de la hemoglobina, citada anteriormente en la fracción de proteínas del sarcoplasma, cabe destacar a las denominadas "glicoproteína anticongelantes". Estas son las responsables de las bajas temperaturas de congelación del suero de algunas especies de peces que viven en zonas polares (Trematomus borchgrevinki, Dissostichus mawsoni, Boreagadus gaidar).

La secuencia de aminoácidos de este tipo de proteínas muestra una gran periodicidad. Su peso molecular es del orden de 10.500 a 27.000 Daltons y su conformación es predominantemente "estirada" con algunos tramos en alfa-hélice. En solución se hidratan con facilidad y su acción anticongelante se explica tanto por los grupos metilo de sus cadenas laterales como por la acción hidrofílica de los disacáridos que están unidos a ellas.

NITROGENO NO PROTEICO

La proporción de nitrógeno no proteico respecto al nitrógeno total es del 9-18 por ciento en los peces teleósteos y del 33-38 por ciento en los peces cartilagosos. Las sustancias nitrogenadas no proteicas se encuentran principalmente en el plasma y en el líquido intracelular. Contribuyen en gran parte al aroma y al sabor del pescado y el contenido de algunas de ellas se ha

venido utilizando clásicamente como parámetro químico indicador del grado de frescura del pescado (trimetilamina, bases volátiles...):

Péptidos

Los principales péptidos que se encuentran en la fracción nitrogenada no protéica son:

- Anserina, en cantidades variables que oscilan alrededor de 25 mg/Kg.
- Carnosina, en cantidades semejantes pero solo presente en algunas especies.
- Taurina, en unas cifras próximas a 500 mg/Kg.

Aminoácidos libres

Presentan distinta composición según el tipo de pescado. Por ejemplo, en los pescados pelágicos, los aminoácidos predominantes son: ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, glicina, alanina, valina, histidina y lisina. (JACQUOT, 1961)

En la familia de los escómbridos (atún, bonito...), la histidina domina cuantitativamente entre los aminoácidos libres. Su proporción es del 0.6 al 1.3 por ciento, pudiendo aumentar hasta un 2 por ciento en algunos casos. En el músculo de estos pescados hay además 1-metilhistidina libre.

La fracción de aminoácidos libres, es cuantitativamente muy elevada en los crustáceos, llegando a un 50 por ciento del total de nitrógeno no protéico. Ello explica la "exquisitez" del sabor de la carne de estas especies (MEYER y col., 1973).

Aminas y óxidos de aminas

Los peces marinos contienen 40-120 mg/Kg de óxido de trimetilamina, que después de la muerte del pez se reduce a trimetilamina. Cuando se somete a temperaturas elevadas, el óxido de trimetilamina se degrada a una mezcla de dimetilamina y formaldehído. Este desdoblamiento también puede ser causado por acción de los enzimas propios del músculo de pescado y por ello ambas sustancias pueden encontrarse en cantidades tanto más elevadas cuanto menor sea la frescura del mismo

Los peces de agua dulce contienen menos óxido de trimetilamina, unos 0.5 mg/Kg. Este menor contenido puede tener su origen en los copépodos del plancton, que sirven de alimento a los peces marinos.

Además de trimetilamina y de dimetilamina en la carne de pescado se pueden encontrar metilamina y amoníaco.

Igualmente cabe considerar en este grupo a las aminas biógenas, resultantes de la descarboxilación de aminoácidos, cuyo estudio y su eventual validez como parámetro químico de frescura del pescado serán ampliamente comentados en esta memoria.

Compuestos guanínicos

La creatina se encuentra en una cantidad de 600-700 mg/kg en la mayoría de los pescados. En el grupo de los crustáceos este compuesto se halla sustituido por la arginina.

Compuestos de amonio cuaternario

Se denominan también betainas (bases de trimetilamonio). Son más abundantes en los peces teleosteos que en los elasmobrânquios (peces cartilaginosos); la forma más común es la glicin-betaina; en anguilas se ha encontrado gamma-butirobetaina; en moluscos y crustáceos se encuentran homerina y N-metilpiridina.

Purinas

El contenido de estas sustancias en el músculo de pescado es de unos 300 mg/Kg.

Urea

En los peces cartilaginosos es característica la existencia de contenidos elevados de esta sustancia. Se encuentran cifras de 1.3-2.1 g/Kg de músculo de pescado. Durante el almacenamiento de este tipo de peces se produce el desdoblamiento de la urea en amoníaco por acción de la ureasa bacteriana.

CARBOHIDRATOS

La carne de pescado no contiene carbohidratos en cantidades significativas a excepción del glucógeno. Su

contenido, sin embargo, es también inferior al del músculo de los mamíferos, llegándose sólo a cifras iguales o menores al 3 por ciento. Esta circunstancia tendrá especial importancia en el pH final que alcanza el pescado y en la instauración del "rigor mortis".

En cuanto a los azúcares simples, se encuentran muy pequeñas cantidades de glucosa y de ribosa que son sin embargo, suficientes para interaccionar con grupos amínicos libre y originar reacciones de Maillard.

Algunos peces poseen sabor dulce, este no se puede explicar con el contenido en glucosa libre, ya que es demasiado bajo; pero quizás existan otras sustancias que potencien su sabor (BURGES y col., 1965).

LIPIDOS

El contenido en grasa en el pescado es, como ya se ha citado anteriormente, muy variable. Depende de la especie, del ciclo de maduración sexual, de la época del desove y de las disponibilidades alimenticias.

El depósito graso se puede situar en distintas localizaciones anatómicas: en el músculo en pescados grasos como el arenque; en el hígado en el bacalao, el eglefino o en el abadejo y en otras vísceras en pescados como el lucio y la perca.

Los lípidos del pescado permanecen líquidos a la temperatura del agua del mar, por lo que deben de ser altamente insaturados. Su composición es característica. En la grasa de pescado se halla una elevada proporción de ácidos poliénicos con 4-6 dobles enlaces. Frente a este elevado contenido de ácidos grasos insaturados hay una relativa escasez de tocoferoles de acción antioxidante. Por ello la fracción lipídica del pescado presenta problemas desde el punto de vista de la conservación, sobre todo en técnicas de congelación, por la facilidad con que se oxida.

Los lípidos que no son triglicéridos varían poco en función del estado nutritivo del animal. Son en general lecitinas y otros fosfátidos, algunas ceras y alcoholes, colesterol y ésteres de colesterol y pequeñas cantidades de ácidos grasos libres.

AGUA

Prácticamente se puede generalizar al señalar que existe una correlación negativa entre el contenido de grasa y de

agua en la carne de pescado. Es el contenido hídrico de las especies magras de pescado está entre el 78 y el 81 por ciento. Estos porcentajes se alcanzan también en peces pelágicos, al final de la época del desove en la que el pez no ingiere alimento y se agotan sus reservas grasas que se sustituyen por agua.

El contenido en agua, al igual que el contenido en grasa también varía según la localización anatómica. Brandes y Dietrich (1958) observaron que el contenido en grasa aumenta desde la cabeza a la cola en los peces magros y semigrasos, mientras que sucede lo contrario en las especies pelágicas. El contenido hídrico sigue un patrón inverso al descrito para la fracción lipídica.

Este contenido en agua es muy alto para la mayoría de las especies de pescado. Las excepciones más importantes son el salmón y la anguila, ya que las cifras de agua son en ambos menores (alrededor de un 67 por ciento). El valor energético es más alto por unidad de peso que en otros pescados. Los crustáceos son también una excepción por su bajo contenido en agua (alrededor del 70 por ciento) y su elevado contenido en proteína (20-22 por ciento).

Sin embargo, aunque en general el contenido en agua de la carne de pescado sea elevado, el tejido muscular del pescado fresco libera muy poco líquido, incluso cuando se somete a presión. Ello es debido a que en su estado natural las proteínas se hallan fuertemente hidratadas y el agua queda retenida, carece de libertad de movimiento. Si libera agua, la carne de pescado cocido o del pescado que se ha almacenado durante un tiempo en el frigorífico en condiciones deficientes. La proteína se ha desnaturalizado y el agua ligada pasa a ser agua libre (BURGESS y col., 1965).

VITAMINAS

Vitamina A

Los pescados grasos contienen cantidades apreciables de vitamina A que se encuentra, disuelta en los lípidos del cuerpo. Los pescados blancos prácticamente sólo contienen esta vitamina en su hígado. Como fuentes importantes de vitamina A destacan: la grasa de las vísceras, los músculos, las membranas y sobre todo el aceite de hígado de pescado.

La concentración de vitamina A puede variar diez veces en el músculo de un animal, de acuerdo con su localización anatómica, por ejemplo en los peces planos los valores son

siempre más elevados cerca de los ojos que cerca del ciego (CUTTING, 1969).

El hígado de halibut es muy rico en contenido vitamínico A. Se han registrado cifras de hasta 100.000 mg de retinol/Kg de aceite de hígado. Otros aceites de hígado de pescado como los de bacalao y tiburón son también ricos en esta vitamina, pero menos que el de halibut. En ellos se han encontrado unos contenidos medios de 2.000 mg/Kg para el aceite de bacalao y 12.000 mg/Kg para el aceite de hígado de halibut.

El aceite de hígado de pescados es también rico en vitamina D, y en esto se basaba la costumbre de administrar aceite de hígado de bacalao a los niños antes de que se comercializaran los complejos multivitamínicos.

La vitamina A se encuentra en el pescado en distintas formas, con una variada eficacia fisiológica.

Vitamina D

Su patrón de distribución es similar al de la vitamina A. Así, su principal fuente son los aceites de hígado de pescado, e igualmente el más rico es el aceite de hígado de halibut, con niveles de 50-100 mg/Kg. El aceite de hígado de bacalao, tradicionalmente administrado a niños como soporte vitamínico, tiene un contenido menor en vitamina D, sólo unos 20-25 ng/Kg.

Vitamina E

La presencia de tocoferoles en pescados ha sido muy discutida a lo largo del tiempo. Se encuentran presentes aunque siempre en cantidades muy pequeñas. En el aceite de hígado de pescado, el contenido oscila entre los 18 mg/Kg en bacalao y los 45 mg/Kg que se alcanzan en el "turbot".

Sin embargo, en 1942 Dubouloz y Hedde identificaron en aceites de pescado, particularmente en atun, otros antioxidantes distintos de la vitamina E.

Cabe destacar que en 1949 Kingstad y Folkvord ya encontraron contenidos de vitamina E altos en las huevas de gádidos (bacalao, eglefino...): de 0.6 a 5 mg por 100 g de peso seco. Estos contenidos son casi tan altos como los que se encuentran en cereales.

Vitamina K

La presencia de esta vitamina ya fue detectada en 1945 por Fontaine. La harina de pescado parece ser un producto especialmente rico en esta sustancia.

Vitamina F

Esta vitamina agrupa a los ácidos grasos esenciales: linoleico, araquidónico y linolénico. Estos dos últimos son raros en los lípidos del pescado, que en su defecto contienen otros ácidos grasos poliélicos.

Los aceites de pescados grasos (sardinas, arenques...) y los lípidos de las huevas de salmón ejercen una importante acción curativa sobre ratas con déficit de vitamina F (BAILEY, 1943).

Vitamina B

El músculo de pescado constituye un buen aporte de vitaminas del grupo B. Contiene del orden de 0.05 mg de tiamina por cada 100 g de tejido. Si se compara con los 0.4 mg/g de tiamina que contiene el pan integral, parece una cifra bastante baja, pero sin embargo suficiente (teniendo en cuenta que los requerimientos de tiamina dependen del aporte energético).

El pescado en general es una buena fuente de otras vitaminas del complejo B. Así se encuentran contenidos de 4mg/100g para el ácido nicotínico, 0.3mg/100g para la riboflavina o 50 g/100g en el caso del ácido fólico.

Generalmente los mariscos y crustáceos son más ricos en vitaminas del complejo B que los peces de aleta. (POTTER, 1973).

Vitamina C

En el músculo de pescado no existe vitamina C. El tejido muscular del salmón constituye una excepción puesto que según Fixsen y Roscoe (1939) contiene más vitamina C que el zumo de naranja.

Sin embargo, en huevas y en hígado de pescado existe la suficiente cantidad de vitamina C como para proteger del escorbuto a poblaciones cuya dieta es básicamente piscícola.

MINERALES

Como fuente de minerales, los tejidos de pescado son útiles en cuanto a sus aportes de calcio, magnesio y fosforo.

Moluscos, crustáceos, arenques y otros pescados que se consumen enlatados incluyendo los "huesos" son una buena fuente de calcio, con niveles del orden de 100-200 mg/100g.

El pescado contiene menos hierro que la carne de mamífero, puesto que su músculo está menos irrigado y una cantidad semejante de cobre.

Cabe destacar, por último, la importancia del pescado como fuente de aporte de yodo, ya que en el caso de los pescados marinos su contenido es cien veces mayor que el de la carne de mamífero.

En la tabla 2 se muestran datos referentes al contenido medio de algunos minerales importantes en el músculo de pescado.

Tabla 2. Sustancias minerales en músculo de pescado (BERLITZ, 1988)

Elemento	Cantidad mg/Kg	Elemento	Cantidad mg/Kg
Ca	28-420	Fe	5-528
Mg	240-310	Cu	0.4-1.7
P	1735-2170	I	0.1-1.0

ESTRUCTURA DEL MUSCULO DE PESCADO. (LUDORFF y MEYER, 1979)

Las fibras musculares del pescado presentan una estructura interna semejante a la del músculo esquelético de los animales superiores. Observadas al microscopio aparecen estriadas y en ellas se puede apreciar la disposición en sarcómeros.

Las fibras musculares están constituidas por miofibrillas y éstas por filamentos contráctiles gruesos y delgados (miosina y actina) dispuestos solapadamente, siendo esta particular disposición la responsable de la estriación observada. Los espacios entre las miofibrillas contienen un espacio acuoso denominado sarcoplasma, que incluye proteínas y algunas sustancias de peso molecular bajo. El conjunto está rodeado de una membrana denominada sarcolema.

Sin embargo, la disposición de las fibras musculares a lo largo del cuerpo del pescado es distinta a la de los animales superiores, debido a su especial sistema de locomoción.

Los peces carecen de extremidades unidas a la columna vertebral; las aletas torácicas y abdominales pares, que corresponden a las extremidades de los tetrápodos, se insertan directamente y sirven poco en la propulsión; son más bien órganos para mantener el equilibrio y la dirección en el agua. Las aletas dorsales y anales tienen también una función similar. El movimiento serpenteante de progresión del pez en el agua tiene lugar por contracción alternativa de sus músculos laterales derecho e izquierdo.

Las fibras musculares en los peces, se agrupan en segmentos denominados miotomos, que tienen su origen en el desarrollo embrionario. El número de estos segmentos es independiente del tamaño del pez y el número de fibras es constante para cada especie (DYER, DINGLE, 1961).

Cada miotomo está constituido por un gran número de células musculares situadas paralelamente y en sentido longitudinal. Estas células están insertadas por sus extremos en tejido conectivo e igualmente están envueltas por éste. Las fracciones de tejido que separan los miotomos longitudinalmente se denominan mioseptos y las que lo hacen transversalmente miocomatas.

Se pueden distinguir dos tipos de carne de pescado denominados clara y oscura o bien blanca y roja (aunque ambas sean en realidad rojas). El color rojo se debe a la presencia de mioglobina, más abundante en el músculo oscuro, mientras que en fibras musculares claras se observa una mayor riqueza en sarcoplasma.

Las diferencias anatómicas entre los dos tipos de músculo se traducen también en diferencias fisiológicas. Las fibras rojas, bien irrigadas, son especialmente adecuadas para el metabolismo oxidativo (apropiado en casos de acción sostenida). Por el contrario el músculo blanco es probablemente más adecuado para una actividad vigorosa

durante periodos de tiempo más cortos, puesto que su metabolismo es básicamente anaerobio (HULTING, 1982).

Los porcentajes de carne oscura y clara varían de una especie de pescado a otra. En arenques y caballa se alcanza hasta un 10% de carne oscura que se sitúa entre la piel y la carne blanca. En la familia de los gádidos (bacalao, abadejo...) y en otros pescados magros la proporción de músculo rojo es del 10% y se encuentra formando una capa muy delgada debajo de la piel.

CAMBIOS SUFRIDOS POR EL PESCADO DURANTE EL PERIODO POST-MORTEM (LUDORF y MEYER, 1979; BURGESS, 1978; CHEFTEL, CHEFTEL, 1980).

Cuando se produce la muerte del pez éste presenta unas características de estructura y composición distintas a las que presentará en el momento del consumo, debido a los cambios físicos y bioquímicos que tienen lugar durante este periodo de tiempo.

Estos cambios conducen igualmente a la descomposición del pescado si éste se almacena durante demasiado tiempo o si el almacenamiento se efectúa en condiciones deficientes.

Se puede considerar la siguiente secuencia de acontecimientos:

- a) instauración del "rigor mortis"
- b) inicio de la autoilisis
- c) desarrollo de microorganismos y cambios debidos a su actividad enzimática.

Tras la muerte la interrupción de la circulación sanguínea priva al músculo del aporte de oxígeno, también cesa la eliminación del anhídrido carbónico y del resto de los metabolitos celulares. Con todo ello se instaura un desequilibrio que culmina con la aparición del "rigor mortis" o rigidez cadavérica, caracterizado por la ausencia del ATP necesario para permitir la separación de las proteínas contráctiles: actina y miosina. Se produce una contracción similar a la fisiológica, pero en este caso es irreversible.

Cuando se agotan las reservas de ATP (proceso acelerado por el forcejeo del pez durante su captura). para obtener más energía, las células, en ausencia de oxígeno sólo pueden metabolizar la glucosa por la vía de la glucólisis

anaerobia. El ácido láctico resultante no puede seguir la vía del ciclo de Krebs, por lo que se origina un descenso de pH debido al acúmulo de éste ácido.

Con respecto al tiempo de aparición del "rigor mortis" y las reservas de glucógeno que posee el pez al morir se ha comprobado que hay variaciones estacionales e incluso diarias, independientemente a las provocadas por la lucha durante la captura.

Si el pH desciende hasta el punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares (cerca a 5.5) éstas se desnaturalizan y pierden su capacidad de retener agua, lo que origina cambios de textura.

Esta disminución del pH es también responsable del cese de la glucólisis, por inhibición de los enzimas implicados en este proceso, incluso antes de que se agoten las reservas glucolíticas. Cuando cesa la glucólisis no existen ya más posibilidades de obtención de ATP con lo que se instaura el "rigor mortis".

Los cambios autolíticos que suceden tras la instauración del "rigor mortis" son en principio debidos únicamente a los enzimas contenidos en la carne del pescado (que comparados con los existentes en el músculo del mamífero muestran mayor actividad a bajas temperaturas, y menor estabilidad a las altas).

La actividad autolítica es mayor en el músculo rojo que en el blanco, dentro de una misma especie de pescado.

Entre los cambios de los que es principalmente responsable la acción autolítica cabe citar:

- degradación de nucleótidos con la consiguiente aparición de nucleósidos: ribosa y bases púricas.

- aumento de aminoácidos libres debido a la proteólisis (posteriormente estos aminoácidos, podrán ser descarboxilados por la flora microbiana, siendo el origen de las aminas biógenas).

- en pescados marinos, aparición de dimetilamina y formaldehído, a partir del óxido de trimetilamina.

En cuanto a la proliferación bacteriana cabe señalar previamente que aunque el músculo de pescado vivo es estéril, existen microorganismos en la piel, agallas e intestinos. Cuando el pez está vivo, la piel constituye una barrera para la entrada de microorganismos y la flora

bacteriana intestinal queda también aislada del resto del cuerpo por el peritoneo. Tras la captura, si el pescado es golpeado, debido a una mala manipulación, pueden producirse lesiones que aceleren la colonización bacteriana por parte de esa flora, que es la característica del pescado.

Por acción de los enzimas autolíticos de la carne del pescado, se producen asimismo modificaciones que permiten que la flora bacteriana, antes localizada en la superficie y en los intestinos, colonice también el tejido muscular que por su parte ha empezado también a sufrir modificaciones debidas a la acción enzimática.

La invasión del pescado por parte de los microorganismos es relativamente fácil y rápida, ya que su carne contiene compuestos de bajo peso molecular, como dipéptidos y aminoácidos libres que son rápidamente utilizados por las bacterias.

En una segunda fase los microorganismos ejercerán también su acción proteolítica, liberando aminoácidos, que luego pueden ser descarboxilados por bacterias que poseen esta capacidad enzimática, originando las aminas biógenas, que serán objeto de estudio en esta memoria.

La fracción grasa del pescado también sufre procesos de deterioro que evidentemente serán menos importantes en pescados magros como el bacalao y el eglefino.

El elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados en el pescado implica una gran facilidad de enranciamiento. Los enlaces insaturados captan fácilmente oxígeno, viéndose favorecida esta captación en presencia de la luz, a temperaturas elevadas o en presencia de trazas de metales. Como consecuencia de la oxidación los ácidos grasos se desdoblán formando compuestos de olor y sabor desagradables.

3.- PARAMETROS PARA EVALUAR LA FRESCURA DEL PESCADO

Se han propuesto numerosos índices para evaluar la frescura del pescado. El más clásico y utilizado por el hombre desde la antigüedad es el de la valoración organoléptica. Este tipo de inspección presenta varias ventajas: no necesita equipos ni materiales especiales, es rápido y permite la valoración simultánea de varios parámetros en distintas muestras de pescado (BURGESS y col, 1979). No obstante este tipo de valoración tiene también varios inconvenientes; uno de ellos es que la valoración estará sujeta a las impresiones subjetivas del panel de calificadores, por lo que además será necesario disponer de patrones de comparación (tablas con características a las que se les asigna una numeración relacionada con el grado de frescura de estos productos).

El precursor de los estudios para determinar la frescura del pescado fue Anderson quien, en 1907, estableció las bases del análisis (BURGESS y col, 1979). Desde esta fecha los estudios posteriores de correlación entre las calificaciones organolépticas y los patrones de comparación (EHRENBERG, SHEWAN, 1953) han demostrado la necesidad de disponer de medidas objetivas de carácter físico y/o químico, capaces, además de solventar el problema añadido que se produce al intentar distinguir entre el llamado límite de frescura y el estado de alteración incipiente (GALLARDO y col, 1979).

Se han propuesto numerosos índices para tratar de determinar de una manera cómoda y sencilla la frescura del pescado. Estos índices deben ser capaces de asegurar que ningún pescado en malas condiciones sea dado como bueno; no obstante para verificar que este punto es correcto se recomienda la evaluación simultánea de más de un parámetro.

De entre los numerosos índices propuestos se señala a continuación el fundamento de los más ampliamente utilizados:

3.1- PARAMETROS RELACIONADOS CON COMPUESTOS NITROGENADOS

Se trata de un conjunto de parámetros ampliamente aceptados, ya que se basan en el estudio de compuestos de estructura nitrogenada, especialmente abundante en los productos pesqueros, de naturaleza principalmente proteica.

3.1.1- BASES VOLATILES

Durante la descomposición del pescado se forman diferentes bases volátiles tales como amoníaco y aminas mono, di y trimetiladas. Su análisis se realiza conjuntamente atendiendo a la cantidad de Nitrógeno que poseen.

El hecho de que con este índice se determine más de una sustancia, puede hacer creer que tiene una gran validez como índice indicativo del grado de descomposición, sin embargo ello no es correcto ya que algunos de los compuestos formados únicamente se originan en estados muy avanzados del proceso de degradación (BURGESS, 1979). A pesar de ello es una prueba utilizada con mucha frecuencia y que en España constituía junto a la determinación de trimetilaminas (TMA) y del índice de peróxidos una de las determinaciones bioquímicas especificadas en la Reglamentación Técnico Sanitaria de pescados (R.D. 1521/1977) vigente hasta el año 1984.

Para la determinación de las bases volátiles se emplean dos tipos de métodos:

- a) métodos basados en la destilación
- b) métodos basados en la microdifusión de Conway

a) Métodos basados en la destilación

Son los más extendidos. Se basan en la destilación de las bases volátiles en medio alcalino, para retener a los aldehídos, las cetonas o los alcoholes capaces también de destilar. El destilado se recoge sobre agua o sobre un ácido y se determina su normalidad mediante una valoración volumétrica, expresando el resultado final como "Nitrógeno de bases volátiles".

En la tabla 3 se muestra un resumen de las condiciones de destilación del método original de Lücke y Geidel y sus posteriores modificaciones (GALLARDO y col., 1979).

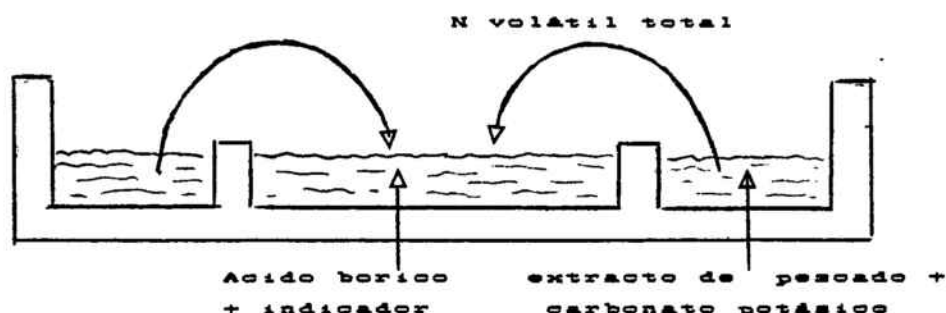
Tabla 3. Condiciones para la destilación de bases volátiles

METODO	MATERIA A DESTILAR	MEDIO ALCALINIZANTE	OBSERVACIONES
LUCKE y GEIDEL 1936	músculo de pescado	MgO	
ANTONACOPOULOS 1960	músculo de pescado	MgO	introduce como modificación un destilador con corriente de aire
HILLING 1958	extracto acuoso	Ca(OH) ₂	
FAO/OMS 1968	extracto TCA	NaOH	
PEARSON Y MUSLEMUDDIN 1968	músculo de pescado	MgO	destilación a 50°C y a presión reducida
GALLARDO Y MONTEMAYOR 1982	extracto TCA	MgO	10 min. destilación, recoge sobre ac. bórico

b) Métodos basados en la microdifusión

Se basa en la adición de carbonato potásico a extracto jugo de pescado desproteínizado, situado en uno de los compartimentos de la célula de Conway. Con ello se libera el nitrógeno volátil, que difunde en la disolución de ácido bórico que se encuentra en el compartimento contiguo de la célula (Fig. 1).

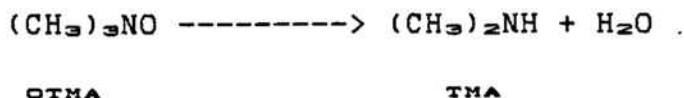
Fig. 1.- Método de microdifusión de Conway para la estimación de bases volátiles (PEARSON, 1986)



Esta microdifusión presenta la ventaja de trabajar a temperaturas bajas (37-45 °C), con lo que se minimiza la hidrólisis de proteínas y la subsiguiente liberación de amoníaco a partir de ellas (que hará aumentar el valor total de Nitrógeno de bases volátiles obtenido). El inconveniente de este método radica en su larga duración, ya que son necesarias al menos 12 horas para que se produzca totalmente la difusión; por ello esta técnica no se aplica a exámenes rutinarios (GALLARDO y col. 1979).

3.1.2.- TRIMETILAMINA

Es un compuesto estrechamente relacionado con el "olor característico" que adquiere el pescado tras su captura. Se forma principalmente por reducción bacteriana del óxido de trimetilamina (OTMA), componente natural del pescado marino:



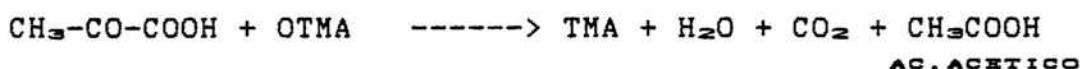
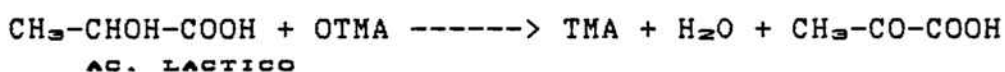
Aunque numerosos estudios demuestran que existe una buena correlación entre el aumento de TMA y el avance del estado de descomposición (SHWEN, JONES, 1957; FRIEDERIC, PAIGE, 1970), su validez como parámetro está limitada principalmente por dos factores:

- su aplicación es exclusiva para el pescado marino, ya que el de agua dulce no tiene el precursor OTMA,

- las cantidades obtenidas son variables; dependen de la especie, estación del año y del propio individuo

Debido a este último inconveniente se considera más correcto utilizar como parámetro la relación OTMA/TMA (FAO, 1969).

La producción de TMA durante la alteración microbiana fue comprobada en 1973 por Beatty y Gibbons (GALLARDO y col., 1979). Aunque ésta sea la principal causa de su aparición, se sabe que tras la muerte del animal la glucosa libre y el glucógeno del músculo sufren una degradación anaeróbica para producir ATP, formándose además ácido láctico que reacciona con el OTMA que a su vez dará lugar a más TMA, tal como se muestra en la siguiente secuencia de reacciones:



A todo ello cabe añadir que ciertos metales pueden catalizar también la reducción del OTMA y originar así más TMA (CASTELL, 1970).

El método más comunmente utilizado para la determinación de la trimetilamina es el método colorimétrico de Dyer. Este método está basado en la determinación espectrofotométrica del complejo coloreado formado por la TMA y el ácido picrico en presencia de tolueno. Aunque este método, publicado por Dyer en 1945, no es totalmente específico debido a las interferencias de la dimetilamina (DMA) y otras aminas (GALLARDO y MONTEMAYOR, 1982), es el método oficial de la AOAC (Association Official of Analytical Chemistry) y en España, se halla especificado en el Real Decreto 1521/1977.

3.1.3- DIMETILAMINA Y FORMALDEHIDO

El precursor de la dimetilamina y del formaldehído es también el óxido de trimetilamina, por lo que estará sujeto a la misma variabilidad de contenido (según estación, especie...) que la trimetilamina.

Su mecanismo principal de formación es la desmetilación del óxido de trimetilamina por acción enzimática, aunque existan algunas especies bacterianas con capacidad para originar estos compuestos.

Los productos de desmetilación del OTMA, formaldehído (FA) y dimetilamina (DMA), se producen por acción de un enzima endógeno, la OTMA-desmetilasa:



La actividad de este enzima varía con la especie, con la estación del año, con los órganos y tejidos de que se trate, siendo significativamente más alta en el músculo oscuro que en el claro (RUIZ y col., 1988).

La DMA parece tener posibilidades de servir como indicador de calidad del pescado congelado (GALLARDO Y MONTEMAYOR, 1982) aunque es necesario una mayor investigación al respecto.

La formación de dimetilamina es especialmente importante en la familia de los gádidos (bacalao, eglefino...) y puede dar lugar posteriormente a la formación de nitrosaminas (incluso después de la ingestión del pescado) con lo que a su interés como parámetro de frescura se añade también un interés toxicológico (BORDERIAS y col., 1987).

La dimetilamina no influye especialmente en los cambios observados en el pescado durante su periodo de descomposición, pero sí lo hace el formaldehído que se origina en cantidades equimoleculares a ella y que es el responsable de los cambios de textura que sufre el músculo de pescado. El formaldehído está muy ligado a las proteínas y es por ello de difícil extracción, por lo que se determina indirectamente cuantificando la DMA presente (CASTEL y col., 1973).

El formaldehído también se ha utilizado como aditivo en productos de la pesca, lo que nos lleva al problema de discernir entre el que es de origen endógeno y el que no (RUIZ MARTINEZ y col., 1988).

3.1.4.- AMINAS NO VOLATILES: HISTAMINA Y TIRAMINA

La estrecha relación existente entre la formación de aminas biógenas y los procesos de deterioro del pescado, permite proponerlas como índices de calidad de estos

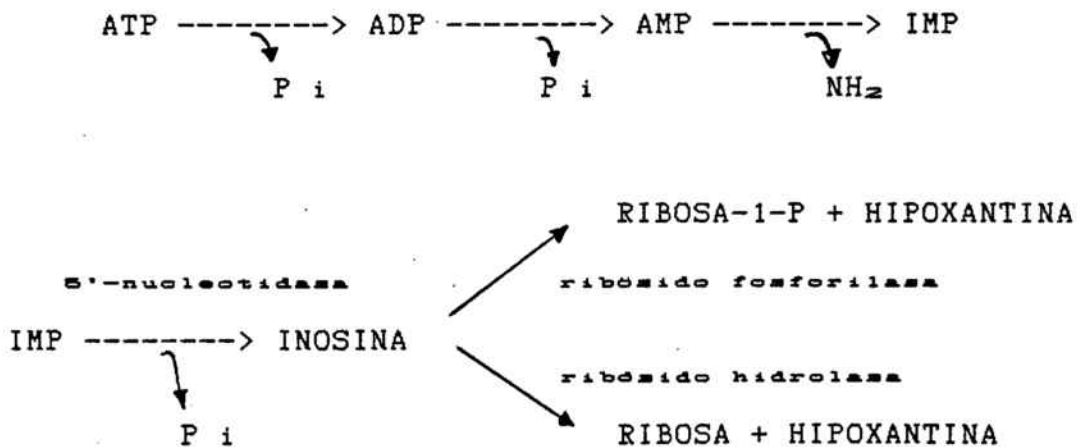
productos, en tanto en cuanto pueden reflejar, a nivel microbiológico, el estado higiénico-sanitario de los pescados y de sus derivados (se exceptúan los productos enlatados sometidos a procesos térmicos durante su elaboración). Las aminas biógenas por su carácter no volátil, serían indicativas del estado de la materia prima utilizada, puesto que permanecen en el alimento tras el tratamiento térmico, al contrario de lo que ocurre con la flora microbiana y con gran parte de las sustancias volátiles que sí se destruyen durante el proceso (VIDAL CAROU, 1987). (ver apartado 4.3).

3.2.- INDICES RELACIONADOS CON LA DEGRADACION DE NUCLEOTIDOS

Se trata de índices relacionados con los cambios que sufre el pescado antes de ser colonizado por microorganismos. En el periodo posterior a la muerte del pez, tras la captura, se originan una serie de cambios que culminan en un periodo de "rigor mortis" seguido del reblandecimiento de la carne. La causa inicial de estos cambios es el agotamiento del ATP y de otros compuestos fosforilados.

Numerosos estudios sobre diferentes especies de pescado comercializadas muestran que el principal nucleótido, el ATP, sufre una desfosforilación enzimática y una posterior desaminación durante la captura (GALLARDO, 1978).

Fig. 2.- Metabolismo del ATP



En la figura 2 se muestra también como el IMP que se acumula, se degrada lentamente "post-mortem", inicialmente a inosina y después a hipoxantina (JONES y MURRAY, 1962).

El ATP y las sustancias relacionadas con su metabolismo, sufren estos cambios mucho antes de que se inicie el deterioro bacteriano; por lo que éstos influirán en los caracteres organolépticos y como consecuencia en la calidad. El IMP que se acumula en las primeras horas es el responsable del denominado coloquialmente "olor a pescado fresco"; por su parte la hipoxantina, de sabor amargo, podrá influir, a concentraciones altas en el sabor del pescado.

Además de su formación precoz, otra ventaja de este tipo de parámetros es su termoestabilidad, siendo también útiles como indicadores de la calidad (en relación con el grado de frescura) de la materia prima de productos enlatados.

3.2.1.- DETERMINACION DE LA HIPOXANTINA

La hipoxantina es el producto final de la degradación enzimática del ATP y de los compuestos relacionados con él. Su contenido aumenta mucho más rápidamente a partir de la proliferación bacteriana (JONES y col 1964).

En diversos trabajos se ha estudiado las relaciones existentes entre el aumento de la hipoxantina y el número de días de conservación del pescado. También se ha estudiado su correlación con la disminución de la calidad organoléptica y con otros parámetros, marcadores de la descomposición del pescado (JONES y col 1964).

Aunque la hipoxantina parece ser un buen parámetro para evaluar la frescura del pescado y sus productos derivados, no se debe olvidar que su contenido es variable según las especies (DYER y col 1966; EHIRA, 1974) y que es mayor en el tejido muscular rojo que en el blanco, circunstancia que debe tenerse en cuenta en el momento de la toma de muestra.

EHIRA y UCHIYAMA en 1973 demostraron que no todas las especies acumulan hipoxantina como producto mayoritario de la degradación del nucleótido, sino que muchas de ellas acumulan inosina. Estos autores clasifican las especies más comunes en Japón en tres grupos según el valor de la relación hipoxantina/inosina. Si ésta es mayor que 5 se

consideran productores de hipoxantina y su determinación es útil; las especies en que el valor es inferior a 1/5 son productoras de inosina y el resto se considera un grupo intermedio. En estos dos últimos grupos la hipoxantina no es el parámetro más adecuado para la determinación del grado de frescura.

Además, debe resaltarse que el contenido en hipoxantina continúa aumentando durante el estado de congelación (ROJAS GIL, 1988) por lo que sería útil como índice de calidad en pescados congelados, pero orientaría muy poco acerca del estado inicial de la materia prima empleada.

3.2.2.- INDICE K

Se trata de un parámetro de diseño posterior, que se define por la siguiente relación (SAITO y col, 1959):

$$K \% = \frac{\text{Inosina} + \text{Hipoxantina}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{Inosina} + \text{Hipoxantina}} \times 100$$

Es un índice que mide un valor relativo: la proporción entre compuestos desfosforilados y fosforilados en la misma muestra. Tiene en cuenta la inosina y la hipoxantina formada, con lo que supera la limitación de la determinación de esta última para su utilización como parámetro de frescura en especies no estrictamente formadoras de hipoxantina.

Ehira en 1976 realizó un estudio sobre 104 muestras de pescado. Se hizo un análisis estadístico para comparar la adecuación de los índices k, TVB-N y TMA-N. Estos análisis se realizaron en tres grupos de muestras: recién pescados (I), muestras de calidad óptima para comer crudas (II) y muestras de calidad mediana (III). Se dedujo que la determinación de TVB-N y TMA-N no muestran resultados satisfactorios para diferenciar los tres grupos, mientras que sí sería útil el índice K (CASAJUANA, 1987).

3.3 - OTROS PARAMETROS

3.3.1 - DETERMINACION DEL pH

Como parámetro para evaluar la frescura del pescado, presenta la ventaja de todos los métodos físicos: obtención rápida de resultados y la posibilidad de ser aplicado "en cualquier lugar" (no es necesario el laboratorio, puesto que el dispositivo de lectura puede ser trasladado con facilidad) (LUDORFF, 1967).

El pH de la carne de pescado fresco es de alrededor de seis unidades. Este valor es más bajo que en la carne de animales superiores, puesto que su contenido en glucógeno es escaso y el descenso de pH debido a la glucólisis anaeróbica que se produce tras la muerte es menos importante que en éstos. De todos modos, cabe citar que es posible disminuir el pH final inyectando al pescado, antes de la muerte, ciertas sustancias como la adrenalina (HULTING 1980).

Los valores de pH aumentan lentamente durante el almacenamiento. Cerca del límite por encima del cual el pescado deja de ser comestible se alcanzan valores de aproximadamente 6.8 unidades de pH. Valores superiores corresponderían a pescados en fase de descomposición y/o putrefacción.

Sin embargo, es difícil relacionar un determinado valor puntual de pH con el grado de frescura del pescado, ya que el pH final que se alcanza tras la muerte depende de las reservas glucolíticas en este momento, lo cual es muy variable ya que depende del tipo de captura empleada, de si el pescado ha luchado... Si muestra utilidad por el contrario, observar su evolución en estudios de descomposición, e igualmente, se ha estudiado la correlación entre el aumento del pH y la puntuación del test de caracteres organolépticos. Es necesario no obstante, realizar estudios para cada especie, puesto que los valores de pH no son extrapolables (PALANCA y PABLOS, 1987).

La determinación del pH puede realizarse directamente sobre el pescado triturado y homogeneizado, aunque es más aconsejable una dilución con agua destilada, en el caso de que el material sea muy heterogéneo o si está excesivamente seco. En peces grandes, la determinación puede también efectuarse, después de levantar la piel con un bisturí mediante la aplicación de un electrodo de punción (LUDORFF y MEYER, 1981).

También se ha estudiado la relación entre la variación del pH en pastas congeladas de pescado. Se ha apreciado un ligero aumento del pH a lo largo del tiempo de conservación en congelador que pudiere ser debida al acúmulo de aminoácidos y de bases nitrogenadas procedentes de la degradación de diversos compuestos (TEJADA, 1980).

3.3.2 DETERMINACION DE SUSTANCIAS VOLATILES REDUCTORAS

Se comentará brevemente en este apartado el fundamento de la determinación de las sustancias volátiles reductoras (SVR) porque aunque se trata de un índice químico con poca aplicación en la actualidad era una de las determinaciones que especificaba el Real Decreto 1521/77 que aprobaba la Reglamentación Técnico Sanitaria de los productos de la pesca con destino al consumo humano.

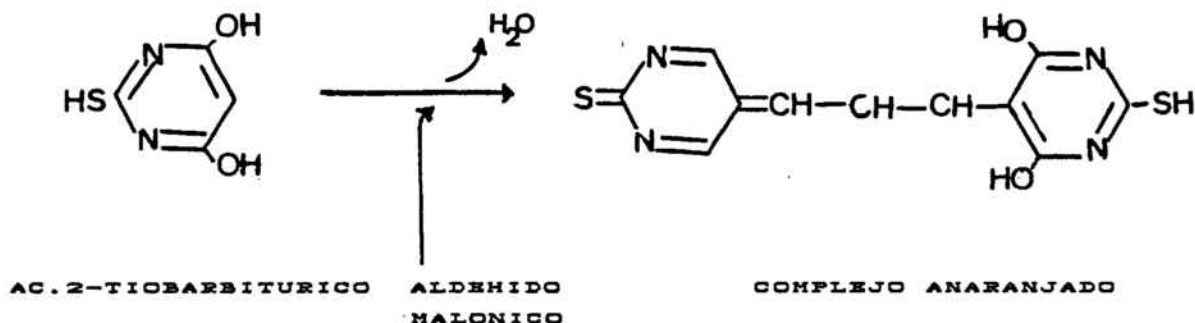
Esta prueba se basa en el hecho de que la mayor parte de las sustancias responsables de los "olores desagradables", son volátiles, y de que la mayoría de ellas son capaces de reducir a un agente químico oxidante tal como el permanganato potásico. observó un alto grado de coincidencia con los resultados obtenidos por paneles de degustación. El inconveniente que presenta este parámetro es que las reacciones químicas debidas a una mezcla tan compleja como las que constituyen las sustancias volátiles reductoras no pueden interpretarse en términos de cantidades precisas de productos particulares de alteración (BURGESS y col., 1978).

3.3.3 - DETERMINACION DEL ACIDO 2-TIOBARBITURICO

La determinación del ácido 2-tiobarbitúrico se ha utilizado como índice de calidad en el caso de pescados grasos, puesto que se trata de una medida de la rancidez; se basa en la reacción del ácido 2-tiobarbitúrico que en determinadas condiciones se combina con el aldehído malónico, producto de la autooxidación de los lípidos altamente insaturados. Mediante esta reacción se origina un complejo de coloración anaranjada cuya intensidad se lee espectrofotométricamente a 530 nm.

En la figura 3 se muestra el mecanismo de la reacción (SINNHUBER y YU, 1977).

Fig.3.-Mecanismo de reacción del ácido 2-tiobarbitúrico con el aldehído malónico.



Se debe tener en cuenta, sin embargo, que en el caso de peces marinos que contienen OTMA, se origina formaldehído (por desmetilación del OTMA) que reacciona también con el ácido 2-tiobarbitúrico aumentando de este modo el valor obtenido en la determinación de este índice (ALMANDROS y col., 1986).

3.3.4 - DETERMINACION DEL INDICE DE PEROXIDOS

Es también una medida de la rancidez de las grasas. Será también pues, como la determinación del ácido 2-tiobarbitúrico un índice para determinar la calidad en pescados grasos (EGAN, 1987).

Existe un norma U.N.E. para esta determinación (U.N.E. 55022). En ella se define el índice de peróxidos como :

"...los miliequivalentes de oxígeno activo contenidos en un kilogramo de materia ensayada, calculados a partir del yodo liberado del yoduro potásico, operando en las condiciones que se indican en la metódica".

Para la determinación del Índice de Peróxidos es necesario la extracción previa de la grasa del pescado por disolución con cloroformo. Al extracto cloroformico obtenido se le adiciona ácido acético glacial y solución de yoduro potásico. El yodo liberado por la acción oxidativa de los peróxidos se valora posteriormente con solución de tiosulfato de normalidad conocida.

3.4 - LEGISLACION ESPAÑOLA EN RELACION CON LA FRESCURA DEL PESCADO.

El Código Alimentario Español designa bajo la denominación genérica de "pescados" a los animales vertebrados comestibles, marinos o de agua dulce (peces, mamíferos, cetáceos y anfibios) frescos o conservados por los distintos procedimientos autorizados. Los mariscos (crustáceos y moluscos) se contemplan en un capítulo distinto en el Código pero todos están regulados por la misma Reglamentación Técnico Sanitaria aprobada por el REAL DECRETO 1521 de 1 de agosto de 1984.

En cuanto a las especificaciones para controlar la calidad de este tipo de productos se debe distinguir entre productos frescos y elaborados. Los primeros son aquellos que "...no han sido sometidos desde su captura a ningún proceso de conservación (no se considera proceso de conservación el desangrado, descabezado, eviscerado ni la adición preventiva de hielo, con o sin sal, o al mantenimiento o refrigeración)". Los productos elaborados se definen en el Artículo tercero del citado Real Decreto, y pueden ser:

- congelados
- verdes, salpresados o salados
- en salazón
- desecados
- ahumados
- seco-salados
- semiconservas
- conservas
- despiezados
- troceados
- picados
- en pasta
- deshidratados y liofilizados
- embutidos de productos de la pesca
- prensados

En el Artículo 23 de la Reglamentación Técnico Sanitaria de los establecimientos y productos de la pesca y acuicultura con destino al consumo humano, se clasifican los pescados, crustáceos y moluscos, en cinco calidades en función de su examen organoléptico: extra, A, B, C y D. Estas calidades están citadas en orden decreciente. Las dos primeras son aptas para todo uso; la clase B no puede emplearse para congelar y sólo será apta para el consumo

local (cuando reuna unas determinadas características); la clase C sólo es apta para el consumo animal y/o consumos agrícolas; y la clase D no es apta para el consumo.

Con la excepción de esta inspección organoléptica que se acaba de citar no se indica en la legislación española vigente, ningún otro parámetro físico y/o químico indicativo de la calidad del pescado fresco y de sus productos derivados.

En el REAL DECRETO 1521/1977 (derogado por el 1521/1984) se citaban como especificaciones bioquímicas para evaluar la calidad del pescado congelado las bases volátiles totales, la trimetilamina y el índice de peróxidos con unos límites que quedan recogidos en la tabla 4.

Tabla 4.-Especificaciones bioquímicas de pescados congelados(Real Decreto 1521/1977).

	CALIDAD EXCELENTE	CALIDAD ACEPTABLE	CALIDAD MALA
BASES VOLATILES TOTALES (BVT) EXPRESADAS EN mg/N POR 100g (METODO DE LUCKE Y GEIDEL, MO- DIFICADO POR ANTONACOPOULOS.	25	25-40	40
TRIMETILAMINA (TMA) EXPRESADA EN mg/N PARA 100g (METODO DE DYER).	5	5-11	11
INDICE DE PEROXIDOS (IP) (ME- TODO DE WHEELER, MODIFICADO POR HADORN)	2	3-10	10

En la reglamentación vigente aparte de especificaciones características para determinados grupos de productos (mínimo del 12% de cloruro sódico para productos en salazón, hermeticidad de envases en conservas y semiconservas o controles de esterilidad en conservas), solamente se dispone en el Artículo 26 del Real Decreto 1521/88 que: " los productos terminados no contendrán microorganismos ni

parásitos patógenos ni sustancias producidas por ellos, en concentraciones que constituyan un peligro para la salud, así como sustancias tóxicas que puedan suponer un riesgo para el consumidor.

Evidentemente, esta disposición es muy ambigua, ya que por ejemplo, y concretamente en relación con las aminas biógenas, cabría pensar en la posibilidad de que las mismas quedaran comprendidas en este grupo de sustancias, producidas por microorganismos que pueden ejercer efectos tóxicos en los consumidores, si bien en la actualidad todavía no es posible, en base a los trabajos existentes al respecto, considerar una cifra límite por encima de la cual se manifiestan muchos efectos tóxicos.

4.- AMINAS BIOGENAS EN PESCADOS

4.1.- ORIGEN Y FORMACION

Mayoritariamente se acepta que las aminas biógenas contenidas en los pescados y muchos alimentos proceden de la descarboxilación de sus aminoácidos precursores. En general se considera que para la formación de aminas y de alimentos es necesario que concurren los siguientes factores (RICE y KOEHLER, 1976; RICE y col, 1976):

1.- Disponibilidad de aminoácidos libres.

2.- Presencia de microorganismos, con capacidad para descarboxilar estos aminoácidos.

3.- Condiciones favorables para el crecimiento de microorganismos y para el desarrollo por parte de estos de la actividad descarboxilásica.

Además, algunos autores, han mencionado la posibilidad de que también puedan formarse aminas biógenas por otros mecanismos. PECHANEK y col (1980) señalan que pueden proceder de reacciones de aminación de aldehidos y cetonas, y HENRY (1960) indica que concretamente la histamina puede ser sintetizada por microorganismos a partir de compuestos más simples, como la urea.

4.1.1 - DISPONIBILIDAD DE AMINOACIDOS PRECURSORES LIBRES

La cantidad de aminoácidos precursores libres en el tejido muscular es un factor importante en la formación de aminas biógenas. Esta cantidad de aminoácidos dependerá de la composición de las proteínas del pescado, que tras una pteolisis debida a enzimas endógenos o de bacterias contaminantes, liberarán los aminoácidos que posteriormente podrán ser descarboxilados originando estas aminas.

En el tejido muscular de los pescados de la familia Escombridae se encuentran cantidades relativamente elevadas de aminoácidos básicos, y entre ellos la histidina, siendo también estos pescados los que más frecuentemente se han relacionado con contenidos altos de histamina.

No obstante, existen estudios ontradictorios sobre la relación: contenido de histidina y formación de histamina. Mackie Y Ritchit (1974) no encontraron proporcionalidad entre la concentración de histamina formada y la disminución del contenido de histidina (FERNANDEZ y MACKIE, 1979). Sin embargo, RICE y col (1976) consideraron que el enzima histidin-decarboxilasa es inducible y por tanto niveles elevados de histidina proporcionarán una mayor actividad descarboxilásica; FOO (1977) señaló que la concentración de histidina en ciertos alimentos podría proporcionar información sobre su capacidad de generar histamina.

La falta de correlación entre estos dos parámetros podría explicarse, en parte, por varias causas:

a) metabolismo de la histidina: en condiciones fisiológicas este aminoácido, en el músculo de pescado es metabolizado por desaminación originando ácido urocánico; sólo en determinadas ocasiones (contaminación bacteriana...) adquiere importancia una segunda vía de metabolización, la descarboxilativa que originará la histamina (MACKIE y FERNANDEZ, 1977).

b) Existencia de microorganismos histaminolíticos: JANZ (1985a, 1985b) observó que 22 cepas de Pseudomonas aeruginosa tenían capacidad para degradar la histamina, comprobando que a concentraciones altas de azúcar y/o de cloruro sódico, a temperaturas de alrededor de 30 grados y en medio alcalino este proceso de degradación se aceleraba.

c) Inhibición del enzima histidin-decarboxilasa: según OMURA y col (1978) este enzima puede inhibirse en presencia de cantidades elevadas de histamina.

4.1.2.-FORMACION DE AMINAS BIOGENAS POR ACTIVIDAD BACTERIANA

En 1944 Geiger y col. ya señalaron que la producción de histamina era atribuible a la actividad bacteriana. Comprobaron que no se producían cantidades significativas de esta amina cuando se realizaban incubaciones de extractos de pescado en presencia de inhibidores de la actividad bacteriana (tolueno, cloroformo...), mientras que en su ausencia, aparecían cantidades importantes de histamina, manteniendo todas las demás condiciones experimentales constantes (BALDRATI y col., 1980).

La actuación de los microorganismos sobre el tejido muscular del pescado incluye también procesos previos de proteólisis, que dejan aminoácidos libres, los cuales podrán ser descarboxilados y convertidos en aminas biógenas.

Salvo en derivados que requieran para su obtención procesos fermentativos (por ejemplo en las anchoas), la presencia de aminas biógenas en pescados debe considerarse como "no deseada". Aunque el músculo de pescado es estéril cuando el pescado está vivo, tras la captura, pueden encontrarse bacterias histamino-productoras en la piel, las agallas y los intestinos. Así TAYLOR y SPECKHARD (1983) citan que si hay almacenamientos prolongados a temperaturas inadecuadas puede haber una invasión de estos gérmenes al tejido muscular.

Las propias características de composición y estructura del músculo de estos animales también son responsables de la rápida proliferación bacteriana (puesto que en ellos se implanta un "rigor mortis" que no cursa con acidificación del medio, y por ello no se retrasa el crecimiento bacteriano, como sucede con otros animales).

La higiene es probablemente el factor más importante que condiciona la formación de aminas biógenas en pescados, puesto que la flora microbiana normal de estos animales (Pseudomonas, Acromobacter, Flavobacterium, Vibrio y Bacillus) no parece tener gran capacidad aminoácido descarboxilásica (TAYLOR, 1985), mientras que los microorganismos más relacionados con esta actividad aparecen en el pescado como consecuencia de contaminaciones externas. Entre ellos se citan: Enterobacterias (KAROLUS y col 1985), Clostridium y Lactobacillus (TAYLOR y col., 1979; TAYLOR, 1985).

Los estudios de HEVERKA en 1967, demostraron que un 71.74% de las enterobacterias aisladas del pescado tenían capacidad para producir histamina (EITENMILLER y SOUZA, 1984). Concretamente dentro de esta familia se han señalado las especies: Proteus morganii, Klebsiella pneumoniae, Hafnia alvei (TAYLOR y col, 1979; TAYLOR, 1985).

Aunque existen numerosos trabajos realizados sobre la actividad aminoácido descarboxilasa de la flora bacteriana del pescado (FRANCK y YOSHINAGA, 1984; YOSHINAGA y FRANCK, 1982; CATTANEO y col., 1984), se trata en su mayoría de tipo cualitativo y van encaminadas a conocer si un determinado tipo de microorganismos posee esta capacidad o no.

En este sentido Baranowski (PAN y JAMES, 1985), comenta algunos métodos para medir la actividad aminoácido

descarboxilásica haciendo hincapié en la importancia de la misma, ya que existe un amplio margen de variabilidad en cuanto a la actividad descarboxilásica en bacterias aisladas del atún (YOSHINAGA y FRANCK, 1982). EITENMILLER y col. (1981) estudian asimismo la producción de histidin-decarboxilasa e histamina por parte de Proteus morganii y concluyen que la máxima actividad se presenta a 37 grados Centígrados y a un pH de 6.5, aunque esta actividad disminuye con la "edad" del cultivo.

BEHLING y TAYLOR (1982) señalan dos grupos de bacterias productoras de histamina en función de su distinta capacidad al respecto:

a) bacterias formadoras de grandes cantidades de histamina (>100 mg/100ml), en un medio de cultivo adecuado y durante un periodo de incubación de menos de 24 horas, a temperaturas superiores a 15 grados Centígrados. Se incluyen en este grupo: Proteus morganii, Klebsiella pneumoniae y Enterobacter aerogenes.

b) bacterias formadoras de menores cantidades de histamina (<25 mg/100 ml), en el mismo medio de cultivo pero tras una incubación de 48 horas o más y a una temperatura de 30 grados centígrados. Entre estas se pueden citar: Hafnia alvei, Citrobacter freundii, Escherichia coli.

4.1.3 - OTROS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FORMACION DE AMINAS

Además de la presencia de los aminoácidos precursores y de los microorganismos responsables de la descarboxilación en la formación de aminas también influye la presencia de diversos factores que favorecerán o no el crecimiento de estos microorganismos y el desarrollo por parte de ellos de la actividad aminoácido-descarboxilásica. Se trata de caracteres físico-químicos relacionados con las condiciones del entorno en que se desarrollarán las bacterias. Entre estos parámetros cabe señalar como importantes: la actividad del agua, el pH y la temperatura.

La actividad del agua está directamente relacionada con el crecimiento de microorganismos. Como ya se ha señalado en el apartado 2, la actividad del agua en el pescado fresco es elevada y ello favorece el crecimiento bacteriano. De hecho muchos métodos empleados para conservar el pescado se basan (además de en otros factores) en una disminución de esta actividad (BANWART, 1982).

El pH del medio influye en el crecimiento de los microorganismos y en la efectividad de sus sistemas enzimáticos. A su vez, la presencia de metabolitos, consecuencia de la actividad bacteriana, puede igualmente variar el pH del medio.

El pH de la carne de pescado es relativamente elevado, más alto que el de la carne de los mamíferos, debido a que su alto contenido en glucosa y glucógeno, limita la glucólisis anaeróbica que se produce tras la muerte del animal, y que es la responsable del descenso del pH por acumulación de ácido láctico.

El tejido muscular de los escómbridos se ha señalado que posee un pH entre 6 y 6.5 unidades. Los microorganismos proteolíticos se desarrollan bien en estos pH, lo cual favorece la aparición de aminoácidos libres, precursores de aminas, como ya se ha señalado. A medida que el pescado se deteriora, el pH aumenta debido a la formación de metabolitos básicos (TMA, DMA...) (LUDORFF y MEYER, 19879).

El pH óptimo para la formación de histamina, según BARANOWSKI y col. (1984), se encuentra entre 5.1 y 6.5. Para el desarrollo de la actividad enzimática en Clostridium perfringens el pH óptimo es de 2.5 a 3.2 y para Klebsiella pneumoniae es un pH de 4. Aunque a pH 6 sigue manteniendo en 70% de su actividad descarboxilásica.

EITENMILLER y col, 1981 estudian la producción del enzima histidin-decarboxilasa y de histamina por parte de Proteus morganii y su relación con el pH del medio, señalando que la máxima producción del enzima se sitúa a pH próximos a 5, sin embargo, a este pH el crecimiento bacteriano está muy inhibido. Koessler y col. en 1928 sugieren que ello es debido a una teórica acción protectora. Ienestea (1971) encuentra que el pH óptimo para la formación de histidin-decarboxilasa está entre 5 y 5.5 en la mayoría de las bacterias descarboxilásicas. Mientras que el pH de 8.5 es el óptimo para el crecimiento de estos microorganismos, a este mismo pH la actividad histidin-decarboxilásica es mínima.

En cuanto a los valores más favorables de pH para que el enzima histidin descarboxilásica tenga una actividad máxima se ha señalado un valor de 6.5 unidades. Esta actividad desciende rápidamente a ambos lados del máximo. A pH 5 es mínimo, aunque sea el pH óptimo para la síntesis del enzima. A pH por encima de 7 la actividad histidin-decarboxilásica también desciende puesto que la afinidad de la histidina por el centro activo del enzima disminuye (EITENMILLER y col, 1981).

El efecto de la temperatura en la producción de aminas biógenas, concretamente en la histamina ha sido ampliamente estudiado. HARDY y SMITH (1976) demostraron que los pescados mantenidos a temperatura ambiente formaban mucho más rápidamente histamina que los conservados en hielo (YOSHIDA y NAKAMURA, 1982) comprobaron a partir de pescado fresco, en el que no se detectó histamina, que si permanecía a temperatura ambiente, al cabo de 24 horas se habían formado 28.4 ppm de histamina, y al cabo de 48 horas, se alcanzaban las 1450 ppm de esta amina.

YAMANAKA y col (1984a) comprobaron que con un almacenamiento a 20 grados Centígrados se forman cantidades importantes e histamina, sobretodo en los pescados de carne oscura. Sin embargo, estos mismos autores comrueban que aunque 20 grados es la temperatura óptima de formación de histamina en estos pescados, tanto en el músculo claro como en el oscuro, los niveles máximos de histamina, se alcanzan siempre en el primero (contrariamente a lo que a priori cabría espera) (YAMANAKA y col , 1984b).

La temperatura es un factor muy importante en la formación de aminas endógenas puesto que a su vez influye en varios factores relacionados con ésta:

a) puede producir modificaciones en el sustrato, carne de pescado, que favorecerán la posterior colonización bacteriana.

b) influye en el crecimiento bacteriano

c) es un factor importante en la inducción de la actividad aminoácido descarboxilásica y en la actividad enzimática en general.

a) Modificaciones en el sustrato

La temperatura puede modificar el sustrato haciéndolo más propenso al desarrollo microbiano. A temperaturas bajas la colonización bacteriana es sólo un proceso de superficie. Alrededor de los 10 grados C, se han observado cambios importantes en el tejido, que conllevan a que la proteólisis pueda afectar ya al tejido conectivo, poco abundante ya de por sí en los pescados, permitiendo la penetración de los microorganismos hacia el interior del tejido muscular. La temperatura es un factor importante en estas circunstancias ya que favoreciendo el desarrollo de esta actividad enzimática se favorece también la posterior formación de aminas biógenas (Olley y col., 1978 en PAN y JAMES, 1985).

b) Crecimiento bacteriano

Ratkowsky y col., en 1982 (PAN y JAMES, 1985) describieron una ecuación lineal que relacionaba la tasa de crecimiento bacteriano con la temperatura. La ecuación fue posteriormente modificada y permitió hacer estudios con bacterias productoras de histamina, relacionando mediante tablas la temperatura con la tasa de crecimiento bacteriano. De este modo puede tenerse información de la temperatura a la que existe mayor desarrollo bacteriano y por tanto una mayor actividad potencial, aminoácido-descarboxilasa, para un determinado tipo de microorganismos. Se hace referencia a actividad potencial puesto que la temperatura óptima de crecimiento de un microorganismo no tienen porque coincidir con la de su máxima producción de aminos biógenas.

c) Actividad aminoácido-descarboxilasa.

La temperatura tiene en este punto un doble papel, puesto que aunque al elevarse aumenta la velocidad de las reacciones enzimáticas, si es muy elevada puede llevar a la desnaturalización del enzima lo que haría disminuir o cesar la actividad y por tanto la producción de aminos.

Respecto a la termolabilidad, parece ser que los enzimas bacterianos productores de histamina son bastante sensibles a temperaturas por encima de la temperatura ambiente (Olley y Baranowski en PAN y JAMES, 1985). Así la actividad histidin-descarboxilasa desarrollada por Proteus morganii es a 37 grados sólo aproximadamente un 25% de la actividad mostrada por este mismo enzima a 24 grados (EITENMILLER y col, 1981). En este sentido, también Epps en 1945 señaló que el enzima aislado de C. perfringens perdía un 25% de su actividad al cabo de 5 min., después de mantenerlo a 38 grados. Kawabata y Suzuki en 1959 señalaron también para Proteus morganii que manteniendo a 34 grados durante 24 horas sólo se conservaba un 5% de su actividad (PAN y JAMES, 1985).

Así pues, aunque en general al elevarse la temperatura se favorezca el desarrollo de la flora bacteriana y su actividad enzimática, éste último puede disminuirse por desnaturalización del enzima. Para tener unas condiciones de producción máximas de histamina será necesario que se establezca una temperatura de compromiso entre estos parámetros (EITENMILLER y col, 1981).

Los estudios desarrollados para determinar la temperatura óptima de formación de histamina para los diversos microorganismo con actividad histidin-decarboxilasa, muestran discrepancias en los

resultados. Debido probablemente a la utilización de cepas distintas o bien a los distintos tiempos de reacción utilizados en los diferentes ensayos. La duración de estos ensayos es un parámetro crítico al realizar los estudios y temperatura óptima. Según Olley y Bartanowski (PAN y JAMES, 1985) puesto que estos ensayos se basan en estudios de la cantidad de producto presente, después de un tiempo determinado de reacción, la temperatura óptima en la que se observa una mayor cantidad de producto, será sólo válida para ese sistema. En lo que si parecen estar de acuerdo los diversos autores, es que a 0 grados C., no hay formación de histamina o al menos está muy disminuida (EDMUNDS y EITENMILLER, 1978; FERNANDEZ y MACKIE, 1979; TAYLOR, 1985).

En cuanto a los distintos tipos de microorganismos y sus temperaturas óptimas de formación de histamina, podemos citar que:

- a temperaturas bajas, determinados microorganismos mesófilos pueden desarrollar parte de su actividad enzimática. Estudios realizados con bacterias histaminogénicas demuestran que si éstas han podido proliferar antes de estar sometidas al almacenamiento en frío, una vez a esta temperatura, pueden formar histamina. Concretamente Baranowski y col. en 1984 (PAN y JAMES, 1985) observaron que a 2 grados centígrados Klebsiella pneumoniae no crecía, pero permaneció viable y produjo pequeñas cantidades de histamina. Resultados similares observaron Yoshinaga y Franck (PAN y JAMES, 1985) a 4 grados centígrados en K. pneumoniae y C. perfringens, aunque para P. morganii no se pudo demostrar. Estas bacterias habían crecido previamente en una muestra de atún a 37 grados centígrados, que luego se mantuvo a 4 grados centígrados.

- los microorganismos mesófilos tienen mayor actividad descarboxilásica que los psicrófilos (FRANK y col., 1985), sin olvidar a Citrobacter freundii, que es psicrófilo y halófilo y ha sido relacionado con la producción de importantes cantidades de histamina por estos mismos autores.

En definitiva parece claro que si quiere evitarse la formación de histamina en pescados debe controlarse la temperatura a la que se mantiene tras su captura, puesto que la conservación en atmósfera de anhídrido carbónico tampoco impide la formación de aminas biógenas (WATTS y BROWN, 1982). En presencia de antibióticos como tetraciclinas y penicilinas se ha comprobado que hay una menor formación de histamina (FRANK y col., 1981), pero este procedimiento es inadmisibile.

4.2 - CONTENIDOS

Las cifras de contenidos de histamina y tiramina en pescado y derivados son muy variables, puesto que son muchos los factores que influyen en su formación. Además del tipo de pescado también dependen en gran parte de las condiciones y de la época de la captura, así como el sistema de procesado (si lo hay) y de su posterior conservación.

En cuanto al tipo de pescados, en los Escómbridos es donde se encuentran con mayor frecuencia contenidos altos de estas aminas. Ello es debido a que en su tejido muscular contienen cantidades importantes de aminoácidos básicos, y entre ellos de histidina, aminoácido precursor de la histamina (tal como ya se ha señalado anteriormente). Pero también en otras especies, no pertenecientes a esta familia (sardinas, anchoas, arenques...) se observan contenidos altos de estas aminas.

La histamina y sus condiciones de formación han sido extensamente estudiadas, por su relación con intoxicaciones producidas tras el consumo de los pescados antes citados, con contenidos elevados de la misma y por ello denominadas "intoxicaciones histamínicas" (TAYLOR, 1983).

En general, los contenidos más altos de histamina se encuentran en pescados azules (sardina, anchoa, caballa...) donde existe una gran cantidad de histidina libre. En pescado blanco se ha encontrado histidina sólo en niveles muy bajos y al parecer no se forma histamina durante su descomposición (PAN y JAMES, 1985).

También se debe señalar que las concentraciones de aminas varían incluso dentro de una misma pieza. Así, se ha comprobado que las concentraciones de histamina son más altas en las zonas cercanas al intestino. Por otra parte, también es mayor el contenido de esta amina en la superficie del pescado, siendo casi nula en el interior cuando los microorganismos responsables de su formación son psicrófilos anaeróbicos, incapaces de desarrollarse en este ambiente interno. A medida que aumenta la temperatura de conservación del pescado y si la flora contaminante es mesófila, la colonización bacteriana va penetrando hacia el interior y se observará un aumento en la concentración de histamina. Así C. perfringens, por ejemplo es anaerobio y se ha relacionado con la degradación del atún, encontrándose niveles más altos de histamina cerca del intestino (YOSHINGA y FRANK, 1982).

Concentraciones muy elevadas de estas aminas son atribuidas a procesos de deterioro del pescado. En el pescado "recién capturado" la presencia de aminas biógenas es escasa. En muestras destinadas al consumo de atún, bonito de altura, sardina, caballa, bonito y merluza FABER DE FREITAS y col. (1983) encuentran histamina en unos niveles del orden de 45 a 128 ppm. Ante estas cifras, cabe destacar que el pescado analizado no presentaba un grado de frescura importante ya que si así fuera los contenidos de estas aminas deberían ser menores. No obstante, por el momento no se ha precisado un límite concreto de histamina, y por ello la anterior afirmación se hace en base a que un pescado fresco, recién capturado presenta niveles de histamina despreciables.

Como ya se señala en el apartado 4.3 las aminas biógenas por su carácter no volátil pueden ser adecuadas para utilizarlas como parámetro indicador de calidad en el caso de productos conservados, sometidos a tratamientos térmicos durante su procesamiento. Existe una amplia gama de estudios sobre contenidos de estas aminas en este tipo de productos, sobre todo de la histamina por el peligro ya citado de las "intoxicaciones histamínicas".

METZ y KARMAS (1977), el GRUPO DE TOXICOLOGIA de MAJADAHONDA (1982), en productos españoles, y TUAN y TSAI (1981), en productos de Taiwan, señalaron que los tipos de atún, así como el modo de elaboración (agua, aceite, tomate...) no influyen de modo importante en el contenido de aminas biógenas.

En productos españoles el GRUPO DE TOXICOLOGIA de MAJADAHONDA (1982), estudiaron los contenidos de histamina en conservas de atún y sardinas encontrando que eran relativamente bajos. En general se observaron niveles más altos en atún que en sardinas y el contenido más elevado que de 10, 11 ppm (microg/g) en una muestra de atún en aceite. En 1987 FERNANDEZ-SALGUERO y MACKIE estudian el contenido de aminas biógenas en conservas de atún, caballa y sardina producidas y comercializadas en España y los contenidos de histamina determinados fueron también bajos, de 0 a 50 ppm.

PAN y col. en 1982 (PAN y JAMES, 1985) realizaron análisis del contenido de histamina en conservas de escómbridos producidos en Taiwan (la mayoría de las muestras eran exportadas a Alemania y E.E.U.U.). De 92 muestras de atún, el 6.5% contenían más de 100 ppm de histamina incluyendo un 1.1% que sobrepasaban las 250 ppm. De 48 muestras de conservas de caballa, un 16.7% presentaron entre 100 y 250 ppm. Estos resultados parecen poner de manifiesto una mayor tendencia del atún a presentar contenidos altos de

histamina; no obstante, sería necesario dilucidar si esta tendencia es debida a factores intrínsecos del pescado o a las diferencias en las manipulaciones a que es sometido.

YAMANAKA y col (1980) estudiaron los contenidos de histamina en conservas de escómbridos procedentes de mercados del Japón, obteniendo los siguientes resultados:

- carne de albacora de calidad óptima: 7-13 ppm
- " " " " muy baja calidad: 15-52 ppm.
- atún: 14-36 ppm
- sardinas: 25-48 ppm
- caballa: 20-40 ppm.

Se observa que estos contenidos son relativamente bajos, comparándolos con las cifras apuntadas por otros autores. WADA, TAKADA y KIZUMI (1982) encunetran es sardinas también japonesas pero sometidas a un proceso de elaboración distinto, contenidos mucho más altos:

- 366-1440 ppm en sardinas con salvado
- 839-613 ppm en sardina secada y salada

En E.E.U.U., MIETZ y KARMAS (1977) realizaron el análisis e 87 conservas de escómbridos adquiridos en el mercado. De ellas, 83 estaban consideradas de primera clase y su contenido en histamina resultó en 0.28 y 4.02 ppm. Las cuatro restantes contenían entre 8.12 y 80.28 ppm de histamina. Otros estudios realizados también en E.E.U.U., mostraron contendios entre 10 y 170 ppm en un total de 34 conservas comercializadas de atún (KIM y BJELDANES, 1979). En ambos estudios se observó también el incremento de los niveles de cadaverina y otras aminos en el atún descompuesto.

KOH y PARK (1982) también analizaron los contenidos de histamina en productos de conserva, y hallaron los siguientes resultados:

- 22.4 ppm en sardina
- 113.8- 288 ppm en caballa.

En Suecia, también se han realizado estudios de este tipo. Concretamnte se analizarón 49 muestrta de atún enlatado procedentes del mercado. En un 14% de los caos el contenido estaba por encima de las 100 ppm, en un 9% excedía de las 150 ppm (Lonberg y col., 1980, en PAN y JAMES, 1985).

En Holanda, Luten (1981) encontró resultados parecidos, destacando además, 3 conservas de sardinas las cuales contenían entre 1100 y 2400 ppm de histamina (PAN y JAAMES, 1985).

Como podemos observar después de lo expuesto anteriormente, es relativamente frecuente encontrar contenidos altos de histamina en productos elaborados a partir de escómbridos en distintos países. De hecho, brotes de intoxicaciones histamínicas han sido desrritos en todo el mundo (YAYLOR, 1983, TAYLOR, 1988).

Los estudios sobre los contenidos de tiramina son mucho menos frecuentes, seguramente debido a que sus efectos tóxicos, directos se presentan de un modo mucho menos espectacular que en el caso de los debidos a histamina (se exceptúan los efectos tóxicos debidos a la interacción con medicamentos IMAO).

En conservas de escómbridos se observa también una amplia variabilidad para los contenidos de tiramina. Para el atún WORTBERG y col, (1981), HUI y TAYLOR (1983) y SCHULZE y ZIMMERMANN (1980) señalan contenidos que cubren el intervalo de 0 a 947 ppm de tiramina. En caballa en conserva WORTBERG y col (1981) no detectaron esta amina y encontraron hasta 25 ppm en caballa ahumada.

En atún refrigerado RENON y CANTONI (1979) señalan contenidos desde 0.6 a 205.7 ppm de tiramina. Estos mismos autores encontraron niveles muy elevados de esta amina si el atún estaba en malas condiciones concretamente de 295.8 hasta 975.3 ppm.

COGUL-ARDEVOL (1988) encuentra en un estudio de mercado de productos españoles en conserva que de un total de 62 muestras de atún, sardinas y caballa ninguna supera las 10 ppm de tiramina mientras que los contenidos de esta amina es semiconsevas de anchoas son claramente superiores (10 a 70 ppm). En otros productos: pescados blancos, crustáceos y moluscos, los niveles de tiramina y de otras aminas biógenas encontrados no son muy elevados, aunque de modo esporádico se encuentren a veces concentraciones altas. Sin embargo, el número de datos es relativamente bajo y se debe tener en cuenta que la variabilidad dentro de una misma especie puede ser consecuencia del método de acondicionamiento (SANTOS-BUELGA, 1984).

4.3- INTERES TECNOLÓGICO DE LAS AMINAS BIOGENAS

Las aminas biógenas son compuestos que se originan por la acción enzimática aminoácido-descarboxilásica presente en ciertas bacterias. A diferencia de lo que ocurre en otros alimentos (vinos, quesos, embutidos, choucroute...) en los que la formación de aminas puede tener su origen en los procesos microbiológicos empleados durante su elaboración (fermentación). Las aminas biógenas presentes en pescados son consecuencia de actividades microbianas relacionadas con el deterioro (se exceptúan aquellos derivados que requieren un proceso de maduración para su obtención, tal y como ocurre con las anchoas).

BAUGMART y col (1979) comprobaron que en fases avanzadas de la descomposición de ensaladas de carne y arenque se alcanzaba una "estabilidad microbiológica" debida a que los microorganismos no podían vivir en el medio ácido que se generaba. Por ello, consideraron que sería adecuado estudiar la durabilidad de estos productos, en base a metabolitos estables formados por dichos microorganismos; entre estos metabolitos estables se encontrarían las aminas biógenas. Aunque la teoría resulta interesante los autores señalan la dificultad que supone la ausencia de la actividad aminoácido-descarboxilásica en muchos microorganismos. Este es uno de los varios estudios realizados para intentar evaluar la validez de las aminas biógenas como indicadores del grado de frescura de muchos alimentos; sin embargo la mayoría de los trabajos se han dedicado a los pescados, ya que aunque existen numerosos parámetros para conocer su frescura, ninguno de ellos parece ser capaz de unificar los distintos criterios hasta ahora aceptados. Así por ejemplo, en atún enlatado, la determinación del mal estado del producto se ha realizado clásicamente mediante la determinación organoléptica de los olores de la descomposición. Resulta evidente que este carácter ha sufrido variaciones tras el tratamiento térmico al que se someten durante el proceso de elaboración las conservas de atún. Así pues, una determinación basada en sustancias volátiles sería poco útil en este caso, al igual que las valoraciones organolépticas que requieren además personal de gran experiencia y, en todo caso, están sujetas siempre a valoraciones de tipo subjetivo (MIETZ y KARMAS, 1977; STARUSZKIEWICZ, 1977; PRIEBE, 1984).

Aunque las aminas biógenas poseen la doble ventaja de presentar, en principio una buena correlación entre el aumento sufrido por su contenido y el grado de descomposición del pescado y, de ser además no volátiles,

para aceptarlas como buenos parámetros de calidad deberían conocerse los niveles de estas sustancias en productos de calidad aceptable. Además, sería imprescindible el conocimiento de la evolución de las mismas en los procesos de descomposición bacteriana, que debería ser constante y progresiva y no debería responder a causas aleatorias o esporádicas (VIDAL CAROU, 1987).

La tiramina, junto con la putrescina, cadaverina y triptamina fueron estudiadas por RENON y CANTONI (1979), observando que aumentaban sus niveles durante el deterioro, muy por encima de los contenidos en el producto fresco. También YAMANAKA y col (1986) observan incrementos en el contenido de estas aminas a medida que aumenta el estado de descomposición del pescado. En 1987 COGUL-ARDEVOL observó que se producía un aumento de tiramina paralelo al grado de descomposición, al menos durante, un periodo de estudio de 2.5 a 3 días. Por el contrario los trabajos de SANTOS y col (1986) plantean dudas a la propuesta de que la tiramina pudiera ser útil como parámetro de calidad, ya que observan que tras un aumento, el contenido de esta amina en semiconservas de anchoa alcanzaba un máximo y luego se observaba un descenso en su concentración. La temperatura sólo influía en el sentido de retrasar o acelerar este comportamiento.

También la histamina ha sido sugerida por numerosos autores para ser utilizada como parámetro de calidad de los productos pesqueros. WILLIAMS (1954) señala su relación con el estado de deterioro del pescado y destaca su posible importancia como indicador, ya que resiste los procesos tecnológicos en virtud de su gran estabilidad térmica. Otros autores señalaron también posteriormente la validez de este parámetro de calidad (EDMUNDS y EITENMILLER, 1975; STARUSZKIEWICZ, 1977; MONTES, 1981).

Sin embargo, otros autores plantean dudas sobre la validez de la histamina como indicador (TOKUNAGA y col 1982), y en este sentido, MIETZ y KARMAWS (1977) son partidarios de tener en cuenta más de una amina para definir un índice de calidad. Consideran que la histamina por sí sola no es adecuada debido a la variabilidad que ofrece su concentración, circunstancia también observada por YAMANAKA y col (1986). MIETZ y KARMAWS proponen un índice de frescura basado en la siguiente fórmula:

$$I = \frac{Hm + Cad + Put}{1 + E + Ed}$$

- Hm: concentración de histamina
 Cad: concentración de cadaverina
 Put: concentración de putrescina
 E: concentración de espermina
 Ed: concentración de espermidina

Así, cuanto mayor es el valor alcanzado por el cociente, más avanzado está el deterioro del producto estudiado. Las aminas que figuran en el denominador han sido encontradas en el atún en buenas condiciones y estos mismos autores comprobaron que su concentración no aumentaba al avanzar el estado de descomposición, con lo que su presencia es por ello un factor que disminuye el valor del índice antes propuesto.

JHAVERI y col (1982) plantean también dudas sobre la aplicabilidad de la histamina como indicadora, basándose en que sus niveles no empiezan a aumentar hasta el décimo día de iniciada la alteración. GALLARDO col (1984) señalan que esta amina sólo es detectable cuando se superan los 6mg/100g de TMA.

A pesar de que no está definitivamente resuelta la relación entre contenidos de histamina y el grado de descomposición, en algunas industrias se utiliza la determinación de esta amina como parámetro de control de calidad (LIEBER y TAYLOR, 1978; PAN y JAMES, 1985). De hecho, han sido retirados del mercado lotes de productos que contienen niveles excesivamente elevados de histamina (SCHUTZ y col., 1976).

Por último, cabe señalar que también se ha sugerido la determinación de la cadaverina y la putrescina para actuar como eventuales indicadores químicos del deterioro. La base de esta sugerencia está en que tanto los microorganismos mesófilos como los psicrófilos, que están relacionados con este proceso, tienen mayor afinidad por sus aminoácidos precursores (lisina y ornitina) que por la histidina (FRANK y col, 1985). No obstante esta posibilidad se desestimó ya desde un principio puesto que el contenido en lisina y ornitina en el músculo de pescado es relativamente baja (STARUSZKIEWICZ y BONZ, 1981; FRANK y col., 1985).

Además la putrescina en concreto puede ser utilizada como fuente de energía por algunos microorganismos y la actividad ornitín-descarboxilásica de los que están relacionados con el deterioro del pescado es muy baja. Todo ello, junto con la circunstancia señalada anteriormente del bajo contenido en aminoácido precursor del músculo de pescado, limita la aplicación de la putrescina como indicadora del estado de deterioro (STTARUSZKIEWIECZ y BONZ, 1981).

4.4 - INTERES TOXICOLOGICO

Las aminas biógenas histamina y tiramina presentan en principio pocos efectos tóxicos por vía oral, debido a que pueden ser destruidas en el tracto gastrointestinal y en el hígado. Existen sin embargo, circunstancias en las que esta protección falta, y el metabolismo de estos compuestos se ve alterado (RANMANTANIS y col, 1984a; CABANIS, 1985). A continuación se especifican algunas de estas circunstancias:

a) actividad enzimática disminuida por causas hereditarias o debido a una patología adquirida. En concreto, las alteraciones funcionales de la mucosa intestinal producen un aumento de la permeabilidad de la histamina. Respecto a la tiramina, en pacientes con cirrosis hepática se han observado aumentos de esta amina en el plasma, que pueden relacionarse con la hipertirosinemia y la menor funcionalidad hepática ligadas a esta enfermedad. Estas condiciones hacen entrar en funcionamiento vías de metabolización secundaria de la tiramina que originan octopamina, la cual tiene capacidad de actuar como falso transmisor dando lugar efectos tóxicos (Faraj y col., 1979 en SANTOS-BUELGA, 1984).

b) aporte de aminas biógenas muy elevado. Este aporte puede ser exógeno o endógeno. En el primer caso la principal fuente serán las aminas biógenas contenidas en los alimentos.

Para la tiramina concretamente EDWARDS y SANDINE (1981) señalan que los niveles tóxicos por vía oral se pueden situar entre 10 y 80 mg de esta amina.

Para la histamina sin embargo, en la bibliografía se señalan cifras muy variables que oscilan desde las 50 ppm que según Ferencik (1970) puede provocar reacciones tóxicas en seres humanos hasta las 600 ppm que para KAROLUS y col (1985) es la concentración suficiente para producir intoxicación. (VIDAL-CAROU 1987).

El aporte endógeno está relacionado con casos en que se ha instaurado una coleopatía por un consumo exagerado de féculas, que originan fermentaciones en el intestino las cuales conllevan una síntesis de histamina.

c) Administración conjunta con medicamentos IMAO (Inhibidores del enzima monoaminooxidasa) o cuando estas aminas se ingieren con otras sustancias que potencian su toxicidad.

Además se debe señalar también que Price y Smith en 1981 (RIVAS-GONZALO, 1981) citan que las aminas biógenas de los alimentos pueden absorberse, al menos en parte, en la mucosa oral, eludiendo así la protección de los sistemas enzimáticos del hígado y del sistema intestinal.

Las aminas biógenas contenidas en los alimentos en cantidades relativamente elevadas pueden ser origen de (VIDAL-CAROU, 1987):

- 1) Intoxicaciones histamínicas
- 2) Migrañas de origen alimentario
- 3) Interacciones alimento-medicamento
- 4) Efectos crónicos por lesiones en el hígado.

4.4.1.- INTOXICACIONES HISTAMÍNICAS

Definición:

La "intoxicación histamínica" es una intoxicación química resultado de la ingestión de alimentos que contienen niveles inusualmente altos de esta amina (TAYLOR, 1988).

Alimentos implicados:

Esta enfermedad se ha asociado mayoritariamente con la ingestión de pescados en malas condiciones pertenecientes a la familia de los Escómbridos (atún, caballa, bonito...) y a la de los Escomberesócidos (paparda...). Pero a menudo también se encuentran implicados otros tipos de pescado, en concreto los de las familias: Pomatomidae, Caryphaenidae, Carangidae, Cupleidae y Engraulidae (TAYLOR, 1985, 1988). También se ha señalado la relación de otros alimentos con estas intoxicaciones. Por ejemplo, tras el consumo de quesos, choucroute y extractos de levadura descrito por Roeglas y col. (1967), Blacwell (1963) y Taylor (1985) (VIDAL-CAROU, 1987).

Por todo ello es mejor utilizar el término antes citado de "intoxicación histamínica" y no el utilizado por razones históricas de "envenenamiento por Escómbridos" (TAYLOR, 1988).

Sintomatología:

Se confunde a menudo con alergias de tipo alimentario. Ello es comprensible puesto que la histamina "in vivo" es el mediador primario de los trastornos alérgicos, por ello estas intoxicaciones se han llamado también "falsas alergias alimentarias" (CABANIS, 1985).

En la tabla 5 se muestran los síntomas más frecuentes de este tipo de intoxicación.

Tabla 5. Síntomas más frecuentes de las intoxicaciones histamínicas. (TAYLOR, 1988).

TIPO	SINTOMAS
Gastrointestinal	Nauseas, vómitos, diarrea, y digestión pesada.
Neurológico	Dolor de cabeza, palpitaciones, rubor, prurito, ardor y picor.
Hemodinámico	Hipotensión
Cutáneo	Sarpullido, urticaria, edema e inflamación localizada.

La espectacularidad con que se presentan estas intoxicaciones no acostumbra a guardar relación con su gravedad (VIDAL-CAROU, 1987).

Epidemiología:

TAYLOR y col. (1984) y TAYLOR (1985), reunieron gran número de datos de la incidencia de las intoxicaciones histamínicas en los distintos países del mundo. Entre ellos destaca Japón, aunque la aplicación de medidas de control ha hecho que la incidencia disminuyera en los últimos años. En la tabla 6 se recogen algunos datos que reflejan la incidencia de estas intoxicaciones.

Tabla 6 Incidencia de las intoxicaciones histamínicas

PAIS	PERIODO DE TIEMPO	BROTOS	AFECTADOS
CANADA	1975-1981	6	12
DINAMARCA	1976-1982	33	?
E. E. U. U.	1968-1979	104	888
FRANCIA	1980-1983	10	?
GRAN BRETAÑA	1976-1982	136	439
JAPON	1951-1954	14	1215
	1970-1980	?	4222
NUEVA ZELANDA	1973-1974	4	11

Se han descrito casos también en otros países pero no se han reunido datos cuantitativos completos. Aunque existe ya numerosos estudios epidemiológicos sobre este tipo de afecciones, probablemente se dan con mayor frecuencia de la que las cifras declaradas indican. Esto puede ser debido a dos hechos (DOEGLAS y col, 1967):

- su corta duración hace que no se les dé importancia
- no se reconocen como tales y se confunden con alergias alimentarias.

Potenciación de efectos:

Aunque se acepte la histamina como agente causal TAYLOR (1985) observó distinta respuesta en el organismo ante la administración de histamina pura y de la histamina contenida en determinados alimentos. Ello hace pensar que en los alimentos puedan existir sustancias que potencien la actividad tóxica de esta amina (RICE y col, 1976; MURRAY y MURRAY, 1981).

El mecanismo de potenciación no se conoce con seguridad, pero se han señalado dos hipótesis:

- inhibición de los enzimas intestinales por parte de sustancias como la tiramina, beta-fenilalanina, triptamina, cadaverina y putrescina (TAYLOR y LIEBER, 1979).

- competencia por los lugares de unión de la histamina con la mucina intestinal.

Por último RAMANTANIS (1984) señala la posibilidad de que en otras intoxicaciones alimentarias (salmonelosis, intoxicación estafilocócica...) los síntomas observados no fueran sólo debidos a ellas sino que podría ser que las aminas biógenas participasen en la sintomatología ya que algunos de los microorganismos causantes de estos trastornos poseen también actividad aminoácido descarboxilásica.

4.4.2.- MIGRAÑAS DE ORIGEN ALIMENTARIO

(RIVAS-GONZALO, 1981; RIVAS y MARINE, 1983; SANTOS BUELGA, 1984; VIDAL-CAROU, 1987)

Definición:

La migraña, jaqueca o hemicrania, es una enfermedad de origen nervioso caracterizada por cefalalgia lateral y periódica, asociada generalmente con trastornos sensoriales y digestivos.

Alimentos implicados;

La relación de algunos alimentos con la aparición de migrañas se conoce ya desde la antigüedad; así por ejemplo, ya Hipócrates advertía que la ingestión de cantidades elevadas de queso podía producir malestar y dolores de cabeza (RAMANTANIS, 1984a).

SMITH y col. (1970) señalan un listado de alimentos relacionados con ataques de migraña, que se muestra en la tabla 7. En ella también se incluyen los porcentajes (respecto al número total de casos) de atribución de la migraña al consumo del correspondiente alimento. Ello se logró relacionar tras realizar una encuesta a 400 pacientes.

Tabla 7. Alimentos relacionados con la aparición de migrañas. (SMITH y col., 1970)

Alimento posible desencadenante	% Atribuciones
Chocolate	76
Productos lácteos (queso)	46
Frutas (cítricos)	30
Bebidas alcohólicas	25
Hortalizas y verduras (cebollas)	17
Alimentos grasos fritos	18
Carne de cerdo	14
Café y Té	14
Alimentos de origen marino	10

Hanington (1967) señaló que un 30% de las migrañas podían ser provocadas por la tiramina contenida en los alimentos (YOUDIM y col, 1971). Sin embargo, aún no se conoce bien la relación existente entre la tiramina y la migraña (BRIGGS y PARGENTER, 1979) y es probable que puedan intervenir factores genéticos. De hecho, es una enfermedad de carácter hereditario y podría tratarse de un ejemplo más de "errores innatos de metabolismo" (SMITH y col, 1970).

También se ha relacionado la migraña con sustancias distintas de las aminas biógenas, también contenidas en los alimentos: cafeína y aditivos alimentarios, como nitrito sódico, glutamato monosódico y tartracina (RIVAS y MARINE, 1983).

En los estudios que relacionan el consumo de alimentos y la aparición de migrañas se han obtenido resultados dispares. Una de las causas que puede justificarlo es la variabilidad de contenido de aminas en estos alimentos ya que puede haber diferencias incluso dentro de un mismo tipo de productos (BRIGGS y PARGENTER, 1979).

Sintomatología:

Los síntomas característicos de la migraña vienen acompañados de náuseas, vómitos, trastornos visuales, estreñimiento y depresión. Además es frecuente que existan antecedentes familiares y que los pacientes presenten un historial clínico con ataques biliares, mareos en los viajes, eccemas, asma o fiebre del heno. También es característica la presencia de periodos más o menos largos entre los accesos dolorosos (CROOK, 1981; FARRERAS y ROZMAN, 1973).

Epidemiología:

Los estudios epidemiológicos demuestran que si bien hasta la pubertad la incidencia de esta enfermedad es la misma en hombres que en mujeres, después de ésta, la frecuencia es mayor en mujeres, puesto que un 60% de ellas sufren ataques migrañosos relacionados con el ciclo menstrual (CROOK, 1981).

En cuanto a las migrañas de origen alimentario, según Smith y col. (1971), constituyen un amplio subgrupo de las migrañas que afectan de un 10-15% de la población mundial (SANTOS-BUELGA, 1984).

Mecanismo:

Para explicar la aparición de migrañas en individuos sensibles se han propuesto varias hipótesis. Una de ellas postula que se trata de un defecto en la metabolización de la tiramina, ya que en estos individuos se ha observado una eliminación menor de esta amina (SANDLER y col., 1974; CROOK, 1981).

La disminución del metabolismo de la tiramina podría explicarse por la inhibición de dos actividades enzimáticas:

a) disminución de la actividad MAO. YODIM y col (1971) observan disminución de la actividad MAO-plaquetaria durante el ataque migrañoso y Marley (1977) comprueba que existe menor actividad de la MAO intestinal en pacientes propensos a migrañas.

b) déficit del enzima responsable de la conjugación de la tiramina con sulfatos, en personas que sufren frecuentemente migrañas de origen alimentario (YODIM y col 1971; TRETHERIE y KHALED, 1972).

Este déficit probablemente obedece a causas genéticas. Se traduce en la dificultad de metabolizar la tiramina, que en condiciones normales, sería eliminada en un 15% en forma de tiramina orto-sulfato.

La migraña se produce seguramente a través de un mecanismo en el que influyen varios factores:

1) la tiramina puede liberar noradrenalina que originará una vasoconstricción de los vasos extracelulares y una constricción focal de los vasos cerebrales. Al agotarse la noradrenalina se produce un efecto rebote de vasodilatación cerebral que da lugar a la migraña (FORSYTHE y REDMON, 1974).

2) La tiramina puede desplazar a la serotonina (5-HT) de su lugar de almacenamiento plaquetario y la serotonina liberada puede ser responsable de los efectos vasculares que conducen a la aparición de la migraña. La tiramina, puede metabolizarse formando octopamina que también produce liberación de serotonina plaquetar (CROOK, 1981).

3) La tiramina puede también provocar liberación de prostaglandinas plaquetarias que igualmente pueden ser responsables de los citados efectos vasculares (SANDLER, 1972).

4) Además, la Tiramina presenta una acción vasoconstrictora directa que puede ser responsable de la vasoconstricción inicial de la migraña.

Por último, cabe indicar que, además de la tiramina, otras aminas pueden estar implicadas en la aparición de migrañas: beta-feniletilamina (GONSALVES y STEWART, 1977); 5-hidroxitriptamina o serotonina (SMITH y col., 1970) e histamina responsable de la "migraña histaminica de Horton" (FARRERAS y ROZMAN, 1978).

4.4.3.-INTERACCIONES DE LAS AMINAS BIOGENAS CONTENIDAS EN LOS ALIMENTOS CON MEDICAMENTOS IMAO.

(MARINE, 1978; RIVAS-GONZALO, 1981; SANTOS BUELGA, 1984; MARINE y VIDAL, 1984; MARINE y col., 1986; VIDAL-CAROU, 1987).

Fundamento:

Los medicamentos inhibidores de la enzima monoaminooxidasa (IMAO) son un conjunto de sustancias heterogéneas capaces de bloquear la actividad de este sistema enzimático, cuya misión es convertir los compuestos monoaminicos en aldehidos. Con la presencia de estos inhibidores queda bloqueada la desaminación oxidativa de las aminas, tanto de origen endógeno como de las de aporte exógeno.

La MAO está compuestas por dos isoenzimas: MAO-A, que metaboliza principalmente la serotonina y la MAO-B que tiene mayor afinidad por la feniletilamina. La tiramina y la noradrenalina pueden ser metabolizadas por cualquiera de los dos isoenzimas (CROOK, 1981).

La MAO metaboliza las aminas exógenas en el tracto gastrointestinal y en el hígado. En condiciones normales éste supone una barrera frente a estas aminas, pero cuando se inhibe la actuación de este enzima, el paso de aminas de aporte exógeno puede dar lugar a efectos tóxicos, puesto que las concentraciones que se alcanzan son, en ocasiones lo suficientemente elevadas como para provocar la liberación de noradrenalina por parte de las neuronas.

El mecanismo de acción de los fármacos IMAO implica el bloqueo enzimático del sistema MAO que conlleva una

acumulación de aminos, debido a que no se pueden metabolizar normalmente, y ello da lugar a efectos de intensidad variable. Los medicamentos IMAO son inhibidores inespecíficos que actúan tanto sobre el isoenzima A como sobre el B (SANTOS-BUELGA, 1984).

Efectos:

Los efectos de esta interacción son debidos principalmente a las aminos simpaticomiméticas de acción indirecta (anfetamina y tiramina), puesto que las de acción directa (adrenalina y noradrenalina) pueden ser también metabolizadas por el enzima catecol-orto-metil-transferasa (COMT) (GOODMAN y GILMAN, 1986).

Los efectos de esta interacción inicialmente se agruparon bajo la denominación "síndrome del queso" (aludiendo al alimento que con mayor frecuencia los desencadenaba). Este síndrome puede implicar la aparición de crisis, a veces muy graves y capaces de originar hemorragia intracraneal y muerte del paciente. También aunque mucho menos graves pueden presentarse cefaleas e hipertermias (SANCHEZ y PLANAS, 1985).

Al principio puede aparecer dolor de cabeza, palpitaciones (con bradi o taquicardia), náuseas, vómitos, fiebre, sudoración, dolor en el pecho, pupilas dilatadas, fotofobia y en casos muy graves coma por hemorragia subaracnoidea (RIVAS-GONZALO, 1981).

El consumo simultáneo de medicamentos IMAO y alimentos con contenidos elevados de aminos, no origina siempre la aparición de estos síntomas. Existen diferencias considerables, entre individuos, e influyen: el sexo, edad, factores de personalidad, capacidad de metabolización de xenobióticos y reservas tisulares de catecolaminas. También será un factor importante el contenido de aminos biógenas en los alimentos ingeridos (RIVAS-GONZALO, 1981).

Las diferencias interindividuales, pueden explicarse en parte, teniendo en cuenta el metabolismo de los medicamentos IMAO. En su mayoría se inactivan por acetilación y al igual que sucede con la isoniazida, existen dos fenotipos acetiladores: uno rápido y otro lento (PLANAS, 1986).

Aminas implicadas:

La tiramina es la amina biógena contenida en alimentos que se ha asociado más corrientemente con este tipo de interacciones. En 1965, BLACKWELL y MABBIT observaron que 6 mg de tiramina, por vía oral, podían originar crisis hipertensivas en pacientes tratados con medicamentos IMAO. De igual modo PONTO y col. (1977), consideran (también en pacientes tratados con IMAO, que estos 6 mg pueden provocar una ligera elevación de presión; 10 mg producen un efecto presor notable y con 25 mg se pueden originar crisis hipertensivas agudas.

BLACKWELL y col. (1965), después de realizar un experimento en el que administraban a animales de laboratorio un extracto de levaduras que contenía histamina y tiramina junto con medicamentos IMAO, concluyeron que los efectos de la interacción producida no se podían atribuir en exclusiva a la tiramina.

Otras aminas, como la feniletilamina, serotonina, 3-hidroxi-fenilalanina (DOPA)... se han relacionado con esta interacción. Mención especial merece la interacción de la reserpina con los alimentos ricos en aminas, puesto que en este caso los efectos resultantes son contrarios a los hasta ahora comentados, esta amina disminuye la acción presora de la tiramina (MARINE, 1978).

Otras aminas biógenas (cadaverina y putrescina) que son sustrato de la MAO, no interaccionan con medicamentos IMAO pero su presencia puede favorecer la absorción intestinal de histamina a la que frecuentemente se encuentra asociadas en los alimentos (ANONIMO, 1965).

Precauciones:

El empleo de medicamentos de tipo IMAO ha sido restringido debido a la importancia de sus efectos secundarios y entre estos de sus interacciones con alimentos (JELLEFF-CARR, 1985). Algunos fármacos incluso han sido por este motivo retirados del mercado, como la eritriptamina y la fenipramina (SANTOS-BUELGA, 1984).

A pesar de que estos medicamentos se siguen empleando existe una tendencia a restringir su uso para casos de depresión neurótica, especialmente en sus formas asténicas. Dado que su efecto terapéutico es muy prolongado, y a que puede persistir incluso varios meses después de cesar el tratamiento debería vigilarse la composición de los alimentos en este periodo de tiempo.

En estos tratamientos se suele aconsejar reducir el consumo de alimentos que clásicamente son susceptibles de contener cantidades elevadas de aminas biógenas. Se han descrito unas recomendaciones dietéticas especiales para este tipo de tratamiento que concretamente se citan como "dietas bajas en tiraminas" (PEMBERTON y CASTINEAU, 198 y ROJAS HIDALGO, 1985).

II.- 5. OBJETIVOS Y ETAPAS DEL TRABAJO

Este trabajo se incluye dentro de un proyecto más amplio que se desarrolla en el Area de Nutrición y Bromatología sobre el tema de las aminas biógenas en alimentos. En concreto, con esta tesina se pretende aportar nuevos datos que permitan evaluar si las aminas biógenas, histamina y tiramina, pueden ser útiles como indicadores del estado higiénico-sanitario de los pescados; si bien en este trabajo se plantea el estudio sólo para una especie "Engraulis encrasicolus" (boquerón).

Igualmente, se pretende completar el trabajo con un estudio del mercado sobre los contenidos de estas aminas tanto en conservas como en semiconservas de pescado, ya que es en estos productos fundamentalmente donde se encontraría la verdadera utilidad de las aminas biógenas como indicadores de la calidad de la materia prima.

Concretamente el trabajo se desarrolla en las siguientes etapas:

- 1.- Adaptación y puesta a punto de una técnica espectrofluorimétrica para la determinación de histamina en pescados, basándose en la que se dispone en nuestro grupo de trabajo para vinos y otras bebidas alcohólicas.
- 2.- Elección y puesta a punto de técnicas adecuadas para la determinación de trimetilamina, bases volátiles totales e hipoxantina en base a métodos ya descritos.
- 3.- Seguimiento de los niveles de histamina y de tiramina a lo largo de la descomposición del boquerón "Engraulis encrasicolus) y comparación de su evolución con la de los parámetros analíticos antes indicados.
- 4.- Determinación de los contenidos de histamina y de tiramina en muestras del mercado de conservas y semi-conservas de pescado.
- 5.- Seguimiento de los niveles de histamina y de tiramina a lo largo del tiempo de conservación de semiconservas de anchoa mantenidas a temperatura ambiente.

III PARTE EXPERIMENTAL

6.1.- DETERMINACION DE HISTAMINA

Se ha utilizado un método para la determinación de histamina en vinos, puesto a punto en nuestro laboratorio (VIDAL-CAROU, 1978), con una fase previa de la homogenización y extracción de la muestra con ácido perclórico 0.4 N tal como proponen EDMUNS y EITENMILLER (1975) para la determinación de histamina en pescados

El esquema del método utilizado es como sigue:

- a) Homogenización y extracción de la muestra con ácido perclórico 0.4 N
- b) Extracción de la histamina con n-butanol en medio alcalino.
- c) Lavado de la fase butanólica con hidróxido sódico saturado de cloruro sódico
- d) Transferencia de la histamina a ácido clorhídrico 0.1 N.
- e) Reacción de formación de fluoróforo histamina-OPT.
- f) Análisis cuantitativo y cualitativo por espectrofluorimetría

6.1.1 INSTRUMENTACION Y REACTIVOS.

APARATOS:

- Espectrofluorimetro Kontron, mod. SFM-25 con Printer-Plotter Kontron mod. 800.
- Centrifuga P-Selecta. Centrónic S-577
- Agitador de tubos Heidolph-Reax 2000
- pH metro Crison digit, mod. 501

REACTIVOS:

- Diclorohidrato de histamina (Merck)
- o-ftaldehido OPT (Merck)
- Cloruro sódico
- Eter de petróleo

SOLUCIONES:

- Acido perclórico 0.4 N .
- Hidróxido sódico 0.1 N y 1 N
- Acido clorhídrico 0.1 N
- Acido cítrico 2 M
- Solución metanólica de OPT al 1%
- Soluciones patrón de histamina en ácido clorhídrico 0.1 N de las siguientes concentraciones expresadas en histamina base: 0.5; 1.5; 1; 30; y 1000 ppm

Todos las disoluciones se prepararon por pesada directa del soluto, excepto las soluciones patrón de histamina que se obtuvieron por dilución de una "solución madre" de 1000 ppm de histamina base.

6.1.2 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparación de la muestra

Se toman de 0.5 a 5 g de muestra (en función del contenido de histamina) previamente triturada varias veces en una picadora doméstica, que se homogenizan con 25 ml de ácido perclórico 0.4 N, se someten a centrifugación durante 10 minutos a 3000 rpm y se separan las dos fases. El residuo sólido se interpone de nuevo con 25 ml de ácido perclórico a fin de lavar y agotar la muestra. Se centrifuga y se separan las dos fases de nuevo, desechándose ya la fase sólida agotada.

Los dos extractos perclóricos obtenidos se filtran y se reúnen enrasándose en un volumen final de 50.0 ml (figura 4).

Extracción y separación

Se toman 5 ml del extracto perclórico y se colocan en un embudo de decantación, se diluyen con 10 ml de agua destilada (a fin de aumentar el volumen de la fase acuosa en la extracción) y posteriormente se alcaliniza con 5 ml de hidróxido sódico 1 N, para alcanzar un pH entre 12 y 13. A continuación se añaden 1.5-2 g de cloruro sódico y se extrae 4 veces con porciones de 30, 30, 25 y 25 ml de n-butanol, agitando dos minutos en cada extracción (en el caso de que la separación entre las fases no resulte satisfactoria se puede añadir una pequeña cantidad de éter de petróleo, 5 ml, para disminuir la polaridad del n-butanol y con ello su afinidad por la fase acuosa)

Las epifases butanólicas reunidas se lavan, en el mismo embudo de decantación, con 10 ml de hidróxido sódico 1N saturado de cloruro sódico y se desecha la fase acuosa. A la fase butanólica lavada se le añaden de 10 a 25 ml de éter de petróleo (dependiendo de si éste ya se ha añadido en las fases de separación o no), se agita y se deja separar desechando la fase acuosa liberada.

Se extrae la fase butanólica con 5 porciones de 10 ml de ácido clorhídrico 0.1N. y se recogen los extractos acuoso-ácidos en un matraz aforado de 50 ml. Por último se añaden otros 25 ml de éter de petróleo, se agita y se deja separar, recogiendo la hipofase acuosa liberada también en el matraz aforado que finalmente se enrasa hasta completar el volumen de 50 ml con ácido clorhídrico 0,1 N (figura 5)

Recta de calibrado por adición de patrones.

Se preparan soluciones del extracto ácido colrhídrico final adicionadas de histamina patrón. En cuatro matraces aforados de 5 ml se colocan : 2 ml de ácido clorhídrico 0,1 N ; 2 ml de solución patrón de histamina 0.5 ppm , 2 ml de solución de 1 ppm y 2 ml de solución de 1.5 ppm, respectivamente y en todos los casos se completa el volumen hasta 5 ml con 3 ml del extracto acuoso-ácido.

Reacción de condensación entre la histamina y el OPT

De cada una de las soluciones anteriores se toman 2 ml que se transfieren a tubos de ensayo. Se añaden 4 ml de hidróxido sódico 0.1 N y 0.2 ml de solución metanólica de OPT al 1%, se agita y se espera 5 minutos para que tenga lugar la reacción histamina OPT. Transcurrido este tiempo, se añaden a cada tubo 2 ml de ácido cítrico 0.2 M , se agita y se lee en el espectrofluorímetro en los máximos de excitación y de emisión de la histamina (340/425 nm). Debe realizarse además un blanco con 2 ml de ácido clorhídrico 0.1 N .

En las figuras 6 y 7 se muestra el mecanismo de esta reacción y el esquema del método operatorio.

Determinación cualitativa

Se efectúa comprobando que los máximos de los espectros de excitación y de emisión de la histamina de las soluciones problema coinciden con los obtenidos a partir de una solución patrón de esta amina. (Fig. 8 y 9)

Cálculos

Para el cálculo del contenido de histamina en pescados debe extrapolarse la recta de calibrado obtenida por adición de patrones sobre el eje de abcisas y el punto de intersección corresponderá a la concentración de histamina (Ca) en los 5 ml de solución final.

La concentración de histamina en la muestra será :

Ca. $5/3 \cdot 50/5 \cdot 50/5 =$ ppm de histamina en pescado

Figura 4 . Esquema de la primera parte de la extracción de la histamina en pescados.

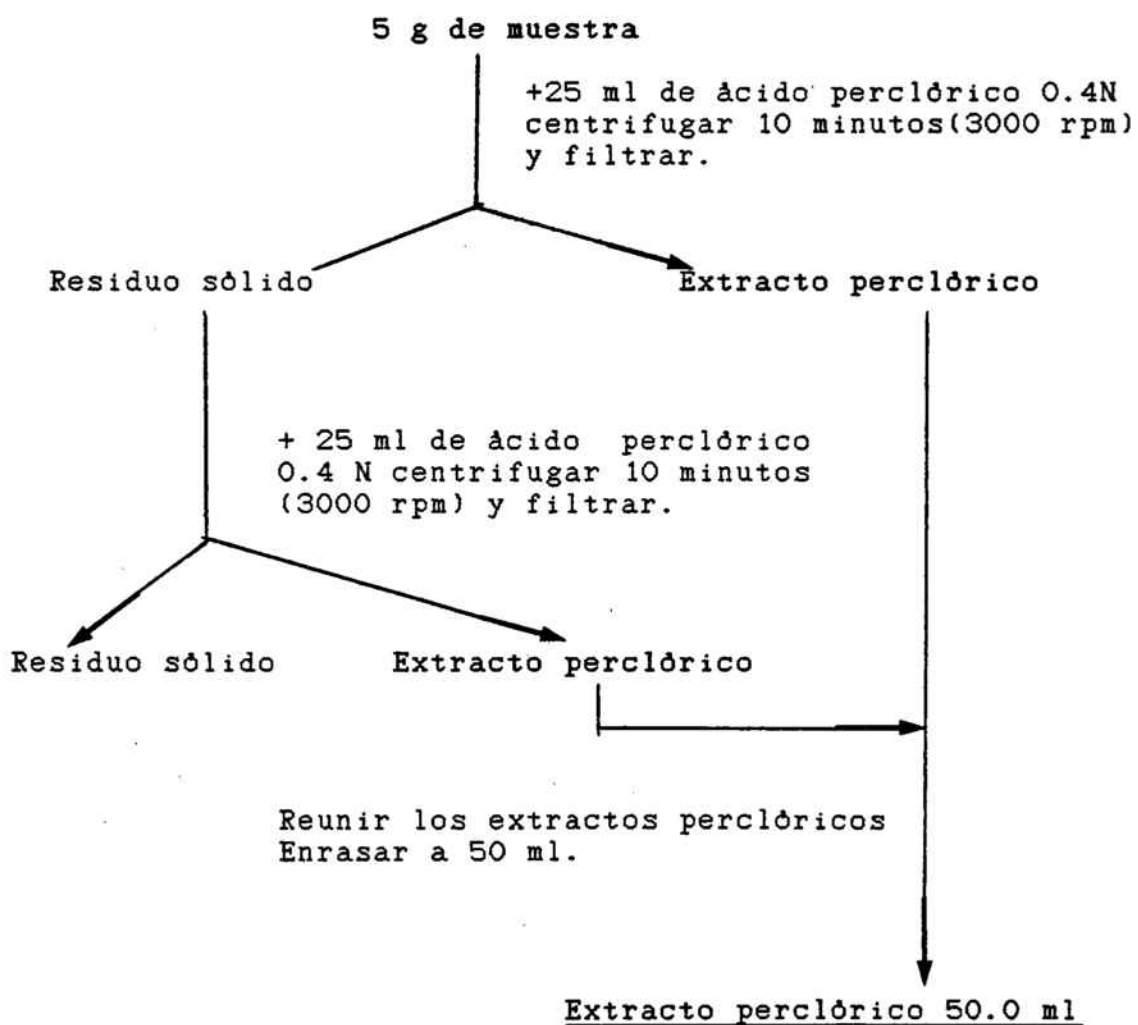


Figura 5.- Esquema de las fases de extracción-separación de la histamina en pescados

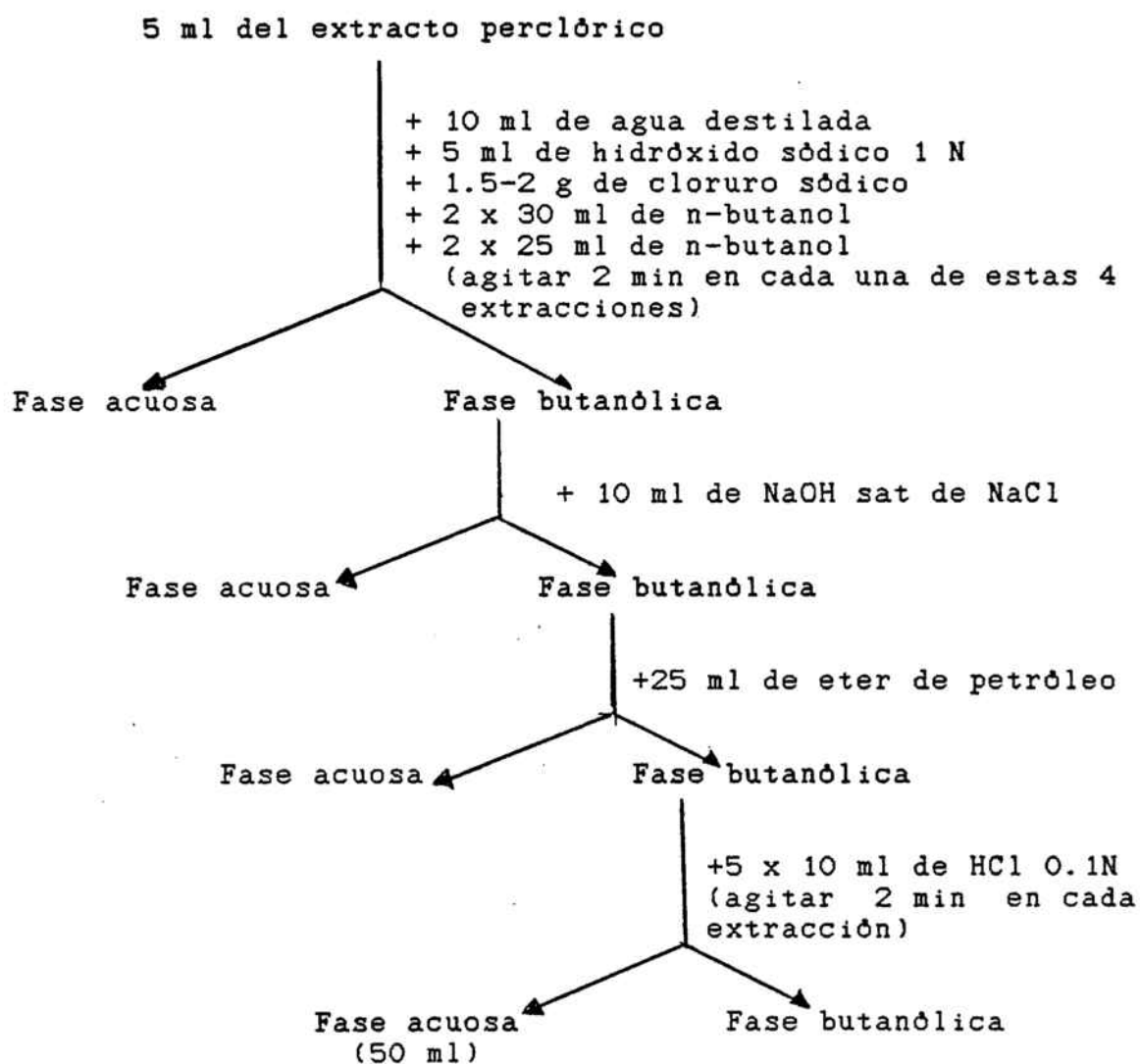


Figura 6.- Esquema de la reacción de entre la histamina y el OPT.

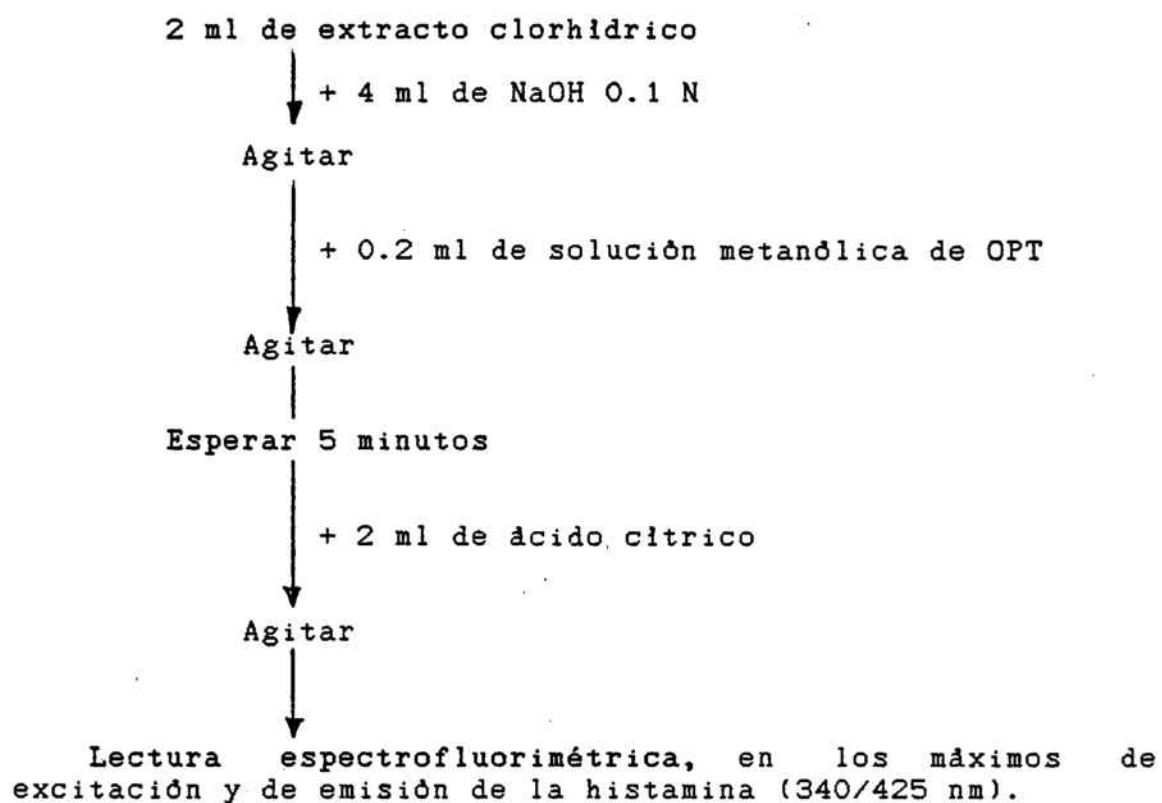


Figura 7 Mecanismo de la reacción histamina-OPT.

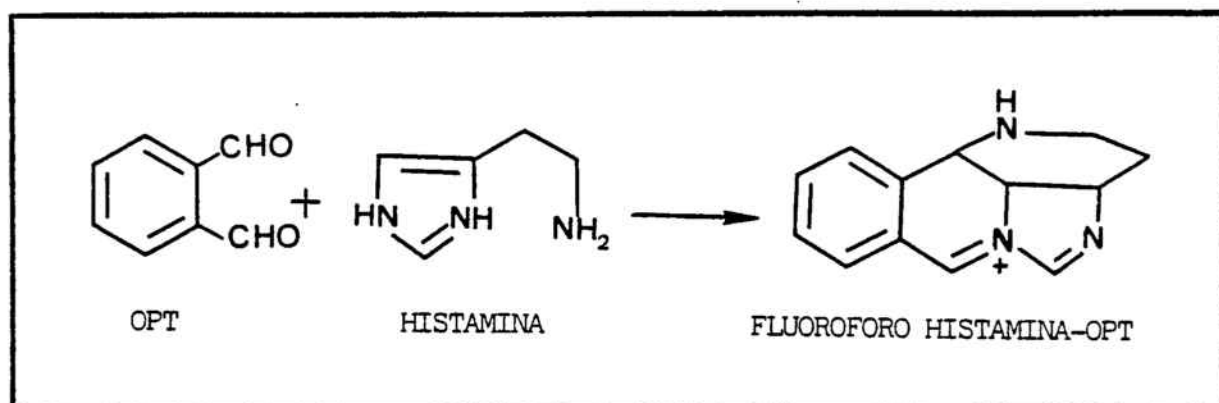


Figura 8 . Espectros de excitación y de emisión obtenidos a partir de una solución patrón de histamina en HCl 0,1 N de 0,3 ppm , tras su reacción con OPT.

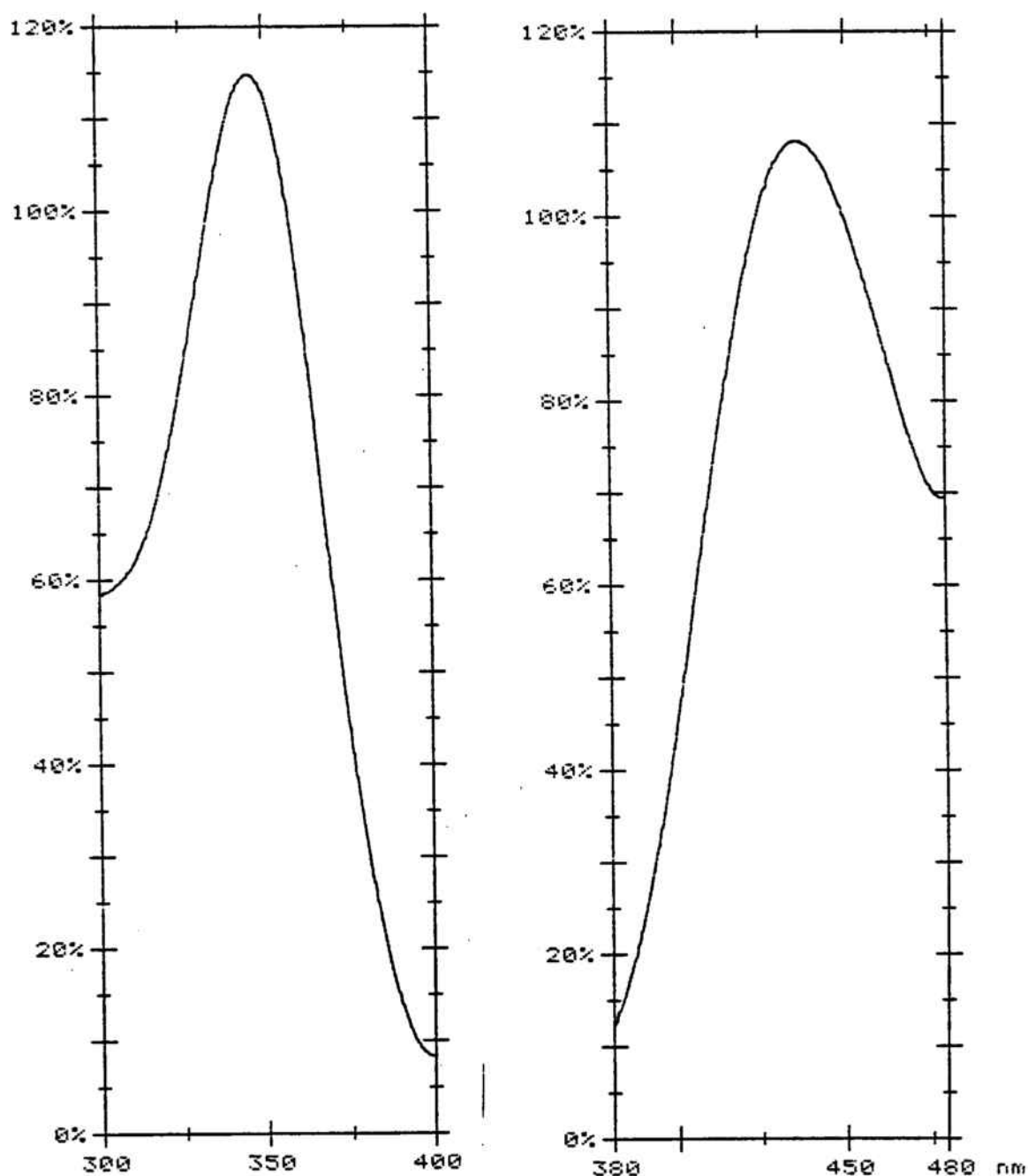
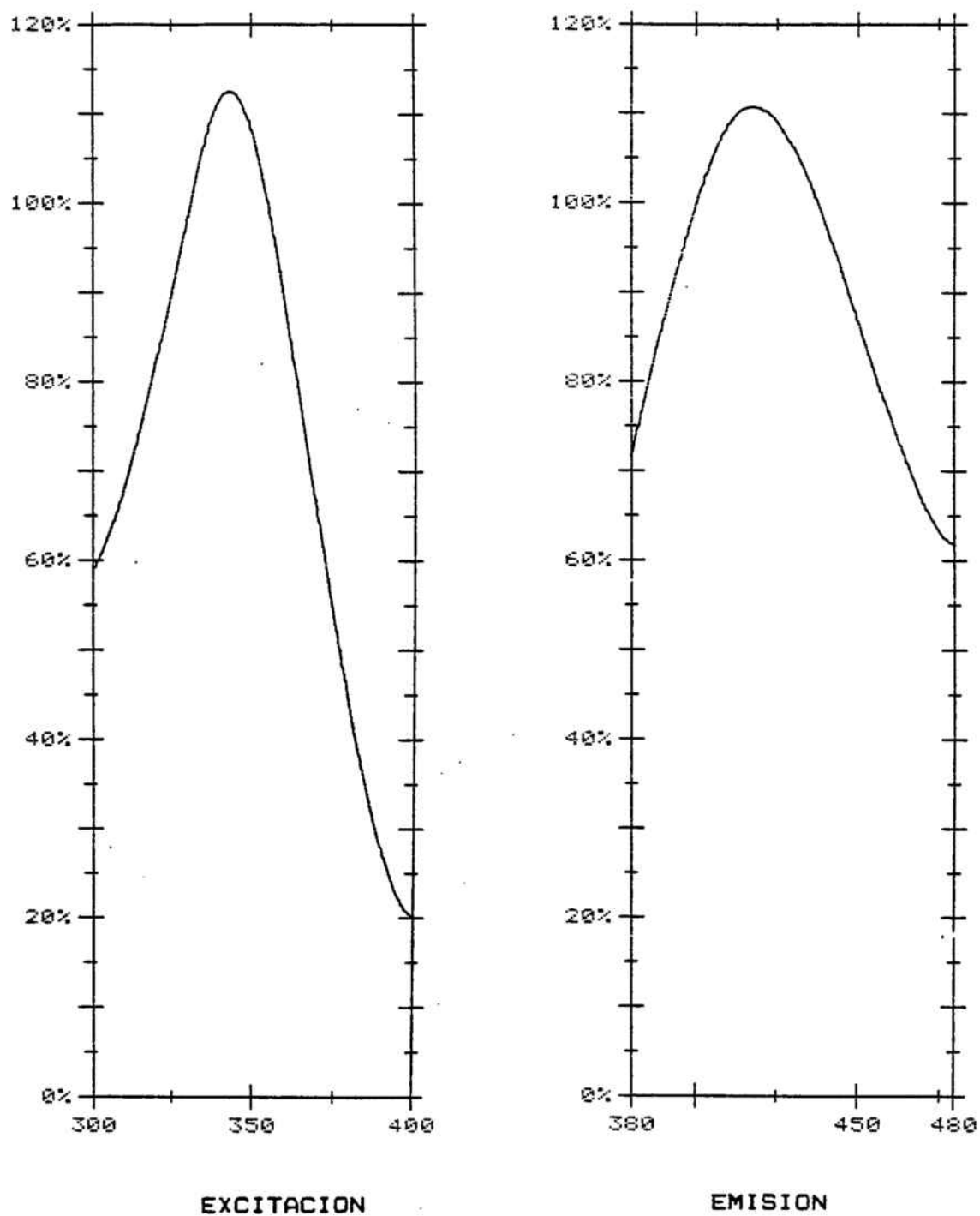


Figura 9 Espectros de excitación y de emisión de la histamina correspondientes a una muestra de pescado en conserva



6.1.3.- VALIDEZ DEL METODO

6.1.3.1.- Precisión

Para estudiar la precisión del método se han realizado ocho repeticiones del análisis de una misma muestra de semiconserva de anchoa. Las determinaciones se efectuaron en días sucesivos pero empleando los mismos reactivos y aparatos. En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en cuanto al contenido de histamina su desviación estandar, el coeficiente de variación y los límites de onfianza.

Tabla 8.- Precisión del método para determinar histamina en conservas de pescado.

nº determinación	contenido en ppm
1	21.05
2	24.10
3	25.70
4	25.40
5	26.00
6	23.40
7	26.65
8	26.35

VALOR MEDIO $\bar{X} = 24.80$

DESVIACION STANDAR $S_{N-1} = 1.88$

COEFICIENTE DE VARIACION $CV = 6.70 \%$

Según HORWITZ (1982), la precisión de un método analítico puede considerarse aceptable si el coeficiente de variación obtenido es inferior al hallado mediante la siguiente expresión:

$$C.V. = 2 (1 - 0.5 \log C)$$

C: concentración del analito en g/ml.

6.1.3.2.- Recuperación

Se realizó un estudio para comprobar la validez del método en conservas y semiconservas de pescado; para ello se siguió el procedimiento de "adición de standard". A una alicuota de la muestra se le añaden 30 g de histamina, y se realiza en paralelo la extracción y la reacción con OPT, a partir de la muestra y de la muestra adicionada.

Finalmente se realizó el análisis de la varianza entre tres grupos de muestra, clasificadas según su contenido, a fin de comprobar si había diferencias entre los resultados obtenidos. En la tabla 8 se muestran las recuperaciones obtenidas en estos análisis

Tabla 8. Recuperación del método para la determinación de histamina en conservas y semiconservas de pescado.

CONTENIDO	% RECUPERACION		
< 10 ppm	102,37	93,20	102,17
	95.60	91.23	95.31
	91.10	98.50	95.49
	94.40		

$\bar{x}_a = 95.93$ $S_{n-1} = 3.98$ C.V. = 4.15%			
10 - 30 ppm	91.1	107.28	96.28
	105.00	95.65	81.54
	102,12	96.32	94,14
	100.45		

$\bar{x}_b = 96.87$ $n-1 = 7.93$ C.V. = 7.63%			
> 30 ppm	96.72	91.22	97.13
	89.12	96.28	103.15
	88.62	96.70	105.67
	101.20		

$x_c = 96.58$ $S_{n-1} = 5.04$ C.V. = 5,22%			

Se comprueba mediante este análisis (tabla 9) que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de recuperación en función del contenido en histamina, con un nivel de riesgo de 0.05 (95%).

Tabla 9.- Análisis de la varianza entre las recuperaciones del método aplicado a muestras con contenido en histamina de distinto orden.

< 10 ppm	10-30 ppm	> 30 ppm
$\bar{x}_a = 95.93$	$\bar{x}_b = 96.87$	$\bar{x}_c = 96.59$
$n = 10$	$n = 10$	$n = 10$
$\bar{x}_t = 95.94$		$n = 30$
HIPOTESIS $H_0 = \bar{x}_a = \bar{x}_b = \bar{x}_c$		
$P = 0.05$		$F_{exp} = 0.1778$
$GL = 2;27$		$F_t = 3.35$
CONCLUSION: $\bar{x}_a = \bar{x}_b = \bar{x}_c$		

Se comprueba mediante este análisis que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de recuperación en función del contenido en histamina, con un nivel de riesgo de 0.05 (95%).

Tras la aplicación de esta fórmula a los resultados obtenidos en los análisis repetidos se concluye que el método será aceptable cuando el C.V. sea menor al 9.7%. El coeficiente de variación obtenido ha sido inferior, del 7.67% por lo que podemos considerar que el método empleado es satisfactorio en cuanto a precisión.

6.2 DETERMINACION DE TIRAMINA

Método de SANTOS y col. (1981)

Este método consta en esencia de las siguientes fases:

- (a) Trituración y homogenización de la muestra alcalinización e interposición con arena de mar lavada y sulfato sódico anhidro.
- (b) Extracción con acetato de etilo en columna de arena
- (c) Transferencia de la tiramina a ácido clorhídrico
- (d) Reacción de condensación de la tiramina con el reactivo α -nitroso- β -naftol.
- (e) Análisis cualitativo y cuantitativo por espectrofluorimetría.

6.2.1 INSTRUMENTACION Y REACTIVOS

APARATOS:

- Espectrofluorimetro Kontron, mod. SFM-25 con Printer Plotter Kontron mod. 800.
- pHmetro Crison digit, mod. 501
- Estufa P-Selecta, mod. 209
- Agitador de tubos Heidolph-Reax 2000

REACTIVOS:

- Acetato de etilo.
- Arena de mar lavada.
- Carbonato sódico anhidro
- 1,2-dicloroetano
- Etanol del 95%
- α -nitroso- β -naftol
- Sulfato sódico anhidro
- Monoclorhidrato de tiramina (Merck)
- Nitrito sódico

Todos los reactivos para los que no se especifica la clase fueron de calidad PA.

SOLUCIONES:

- Acido clorhídrico 0.2 N.
- Acido nítrico 1 N.
- Nitrito sódico al 2.5% (P/V)

- Solución de α -nitroso- β -naftol al 1% (P/V) en etanol del 95 %
- Soluciones patrón, en HCl 0.2 N, de las siguientes concentraciones en tiramina base: 0.15; 0.3; 0.6; 0.9; 1.2; 1.5; 1.8; 30; 40 y 1000 ppm.
- Solución amortiguadora de boratos de pH=10.3+0.1 : 500 ml de solución 0.1M en ácido bórico y en cloruro potásico + 426 ml de NaOH 0.1 N, diluidos hasta 1000 ml con agua destilada. Comprobar finalmente el pH con el pHmetro

Todas las soluciones se prepararon por pesada directa del soluto, excepto las soluciones patrón de tiramina que se prepararon a partir de una "solución madre" de 1000 ppm por dilución con ácido clorhídrico 0.2 N.

6.2.2 DESCRIPCION DEL METODO (SANTOS y col., 1981)

Preparación de la muestra

Se tritura la muestra varias veces en una picadora doméstica a fin de conseguir mayor homogeneidad. Se toma una cantidad de muestra entre 30 y 100 g y de estos una alicuota representativa para el análisis

El peso de muestra que se debe tomar para el análisis (0.5-10 g) dependerá de la cantidad de tiramina que se espera encontrar. En la tabla 10 se indica la cantidad de muestra a tomar en función del contenido aproximado en tiramina.

Tabla 10. Muestra de partida en función del contenido en tiramina

Contenido aproximado en tiramina (g)	<1	>1-5	>5-10	>10-50	>50
Cantidad de muestra (g)	10	5	2	1-2	0.5-1

La muestra pesada a precisión se coloca en un vaso de precipitados de 250 ml y se suspende en 10-20 ml de solución reguladora de $\text{pH}=10.3\pm 0.1$, de modo que quede bien empapada y disgregada en dicha solución. Se añade la cantidad necesaria de carbonato sódico anhidro (entre 0.1-0.3 g) para llevar el pH del conjunto a 10.3 ± 0.1 . El pH se comprueba con el pH metro, se lava luego el electrodo con solución reguladora de pH a fin de recuperar la muestra que haya podido quedar adherida a él y los líquidos de lavado se adicionan también al vaso de precipitados.

La muestra alcalinizada se interpone con arena de mar lavada de grano fino y calcinada y con sulfato sódico anhidro en la proporción 2:1, hasta que el conjunto esté prácticamente seco (las cantidades a añadir son del orden de 120 g para la arena y de 65 para el sulfato sódico anhidro).

Extracción y separación

A la muestra preparada, se ha indicado anteriormente anteriorente, se le adicionan 60 ml de acetato de etilo y se dejan en contacto durante una hora, agitando con frecuencia para avitar que el conjunto se endurezca y se formen grumos.

Transcurrido este periodo de tiempo, se carga una columna de vidrio, de 3 cm de diámetro y provista de llave, con la mezcla anteriormente obtenida. Se lava el vaso con 40 ml de acetato de etilo, que se adicionan también a la columna.

Se realiza la extracción eluyendo un total de 200 ml de acetato de etilo en aproximadamente 3 horas. La elución durante este periodo de tiempo es como se indica a continuación:

- los 60+40 ml añadidos al cargar la columna eluyen durante la primera hora
- antes de que la parte superior de la columna se seque, se añaden otros 50 ml de acetato de etilo que se dejará que eluyan otra en hora aproximadamente
- finalmente se añaden 30 ml más de acetato de etilo, que eluirán en la tercera hora

- con 20 ml de acetato de etilo se realiza un lavado de la columna, con la llave totalmente abierta y los líquidos de lavado se reúnen con el eluato obtenido.

La fase orgánica así obtenida se trasfiere a un embudo de decantación de 250 ml y se extrae 5 veces con porciones de 10 ml de ácido clorhídrico 0.2 N, reuniéndose el conjunto de las fases acuosas en un matraz aforado de 50 ml.

En muestras con contenidos de tiramina de alrededor de 100 ppm es necesario diluir el extracto clorhídrico, antes de proceder a la formación del complejo fluorescente.

En la figura 10 se muestra un esquema del protocolo seguido en esta extracción.

Determinación cuantitativa

Para la determinación final espectrofluorimétrica es necesario realizar previamente la condensación de la tiramina con el reactivo α -nitroso- β -naftol para formar un complejo fluorescente.

En las figuras 11 y 12 respectivamente muestran el mecanismo de esta reacción y el esquema del método operatorio.

Se toman 2 ml del extracto acuoso-ácido obtenido y se les adicionan: 1 ml de solución de α -nitroso- β -naftol, mezclando bien en un agitador de tubos. A continuación se adiciona 1 ml de ácido nítrico 1 M que contiene un 2% (V/V) de disolución de nitrito sódico en agua al 2.5% (P/V). (esta mezcla es de preparación extemporánea) El conjunto se agita nuevamente y se mantiene en una estufa a 60 grados C. y en la oscuridad durante una hora.

Transcurrido este periodo de tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente durante unos 15 minutos. Se adicionan posteriormente 10 ml de 1,2-dicloroetano y se mezcla bien en el agitador de tubos durante 1 minuto aproximadamente, a fin de extraer el exceso de reactivo cuya coloración interfiere en la posterior lectura espectrofluorimétrica.

Se recoge la fase superior por aspiración y con ella se efectúa la lectura espectrofluorimétrica en los máximos de excitación y de emisión de la tiramina (455/540 nm).

La concentración de tiramina se calcula mediante una recta de calibración preparada para cada grupo de determinaciones. Esta recta se construye a partir de las lecturas espectrofotométricas obtenidas para las siguientes concentraciones de tiramina base en HCl 0.2 N :0.15; 0.3; 0.6; 0.6; 0.9; 1.2; 1.5 y 1.8 ppm.

Para la determinación final espectrofluorimétrica es necesario realizar previamente la condensación de la tiramina con el reactivo α -nitroso- β -naftol para formar un complejo fluorescente.

Determinación cualitativa

Se efectúa también por espectrofluorimetría comprobando que los máximos de excitación y de emisión ~~son~~ como los espectros de barrido de la solución problema coinciden con los obtenidos para el fluoroforo formado a partir de una solución patrón de tiramina. (figuras 13 y 14)

6.2.3. VALIDEZ DEL METODO

6.2.3.1 - Recuperación

Se realizó un estudio para comprobar la validez del método en conservas y semiconservas de pescado; para ello se siguió el procedimiento de "adición de standard". A una alícuota de la muestra se le añaden 30 g de tiramina, y se realiza en paralelo la extracción y la condensación con α -nitroso- β -naftol, a partir de la muestra y de la muestra adicionada.

Finalmente se realizó el análisis de la varianza entre tres grupos de muestra, clasificadas según su contenido, a fin de comprobar si había diferencias entre los resultados obtenidos. En la tabla 11 se muestran las recuperaciones obtenidas en estos análisis

Tabla 11 Recuperación del método para la determinación de tiramina en conservas y semiconservas de pescado.

CONTENIDO	% RECUPERACION		
< 5 ppm	86.0	103.7	96.7
	97.0	91.2	90.9
	100.0	108.0	86.0
	99.2		
$\bar{x}_a = 95.78$ $S_{n-1} = 6.93$ C.V. = 7.23%			
5 - 10 ppm	89.1	86.4	95.0
	94.0	101.3	97.1
	89.8	105.6	105.0
	99.3.		
$\bar{x}_b = 96.29$ $n-1 = 6.62$ C.V. = 6.87%			
> 10 ppm	94.5	95.0	85.0
	87.1	93.3	101.3
	90.2	96.8	99.1
	106.5		
$x_c = 94.88$ $S_{n-1} = 6.50$ C.V. = 6.85%			

Tabla 12 Análisis de la varianza entre las recuperaciones del método aplicado a muestras con contenido de distinto orden.

< 5 ppm	5-10 ppm	> 10 ppm
$\bar{x}_a = 95.78$	$\bar{x}_b = 96.26$	$\bar{x}_c = 94.88$
$n = 10$	$n = 10$	$n = 10$

$\bar{x}_e = 95.68$	$n = 30$
---------------------	----------

HIPOTESIS $H_0 = \bar{x}_a = \bar{x}_b = \bar{x}_c$

P = 0.05	F _{exp} = 0.0925
GL = 2;27	F _{tab} = 3.35

CONCLUSION: $\bar{x}_a = \bar{x}_b = \bar{x}_c$

Se comprueba mediante este análisis que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de recuperación en función del contenido en tiramina, con un nivel de riesgo de 0.05 (95%).

Figura 10 . Esquema del método de extracción de tiramina en pescados (SANTOS y Col. 1981).

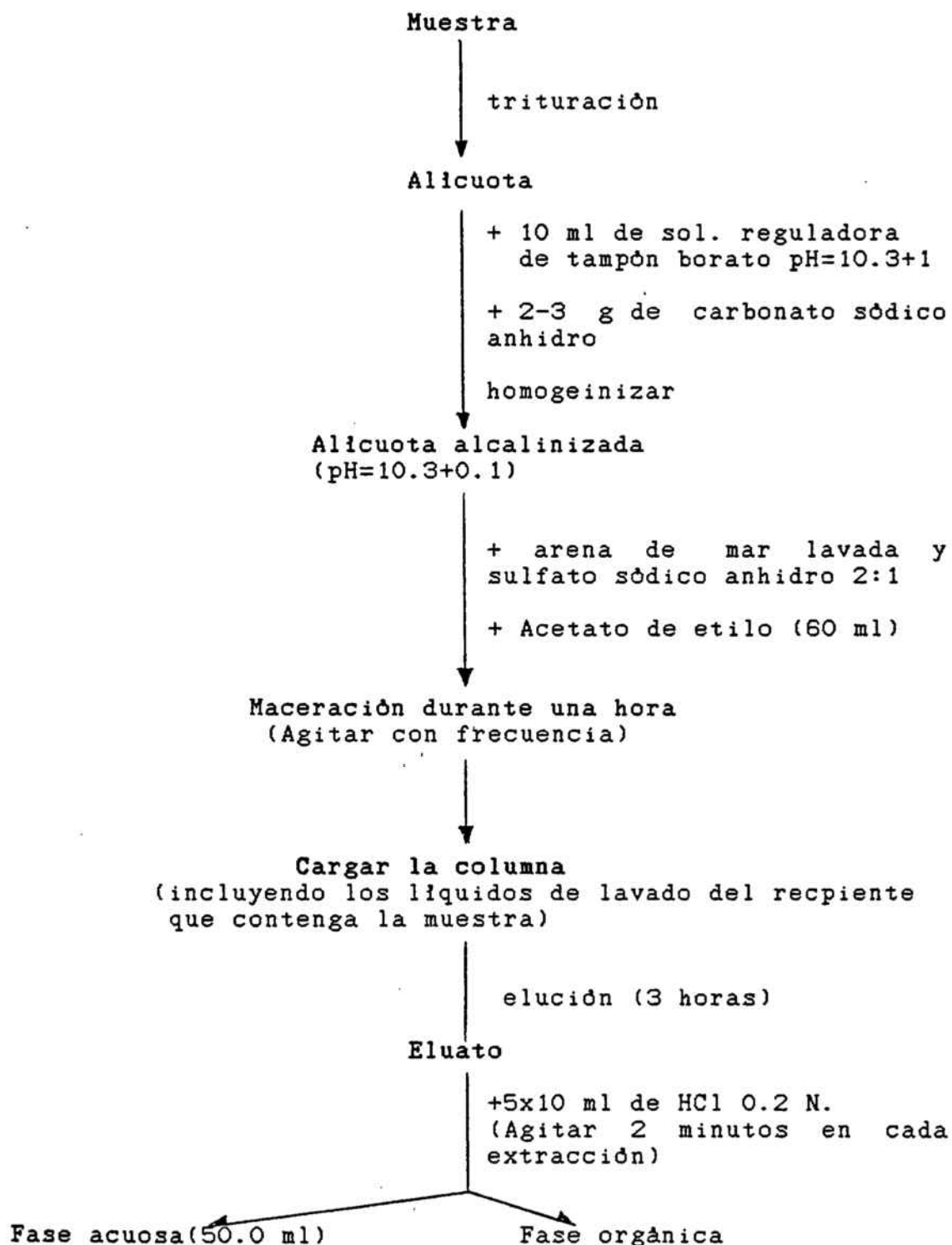


Figura 11 Mecanismo de la reacción de condensación entre la tiramina y el α -nitroso- β -naftol.

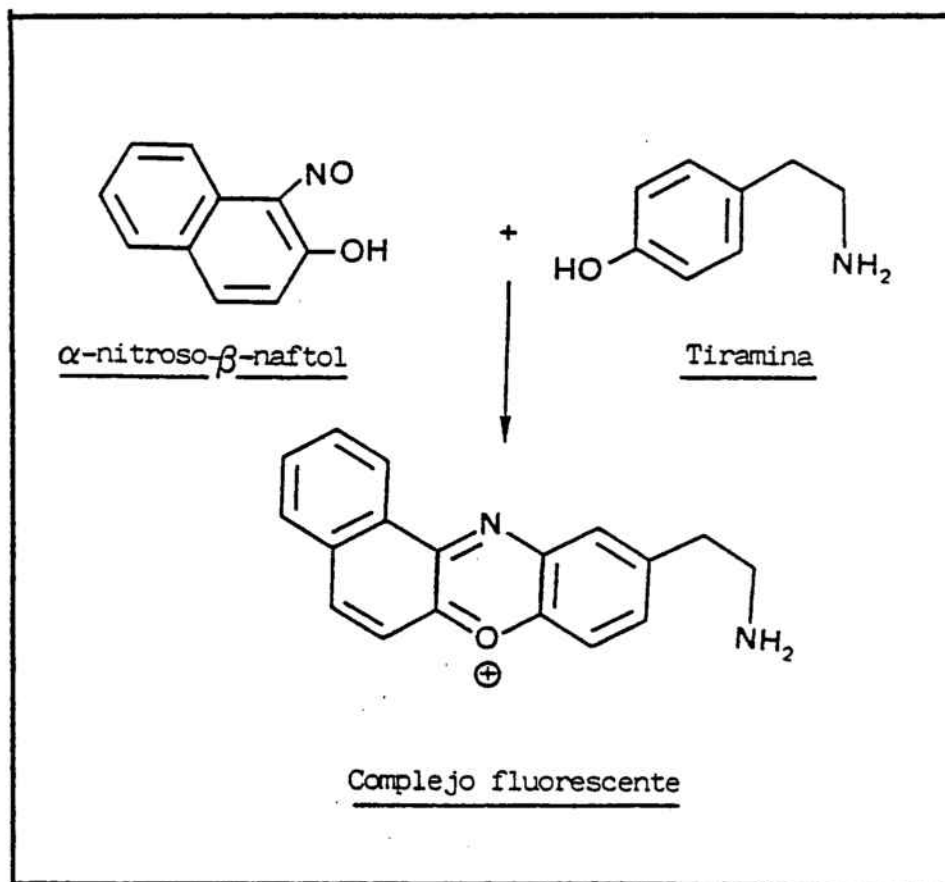


Figura 12 Esquema de la reacción de formación del fluoróforo tiramina - α -nitroso - β -naftol

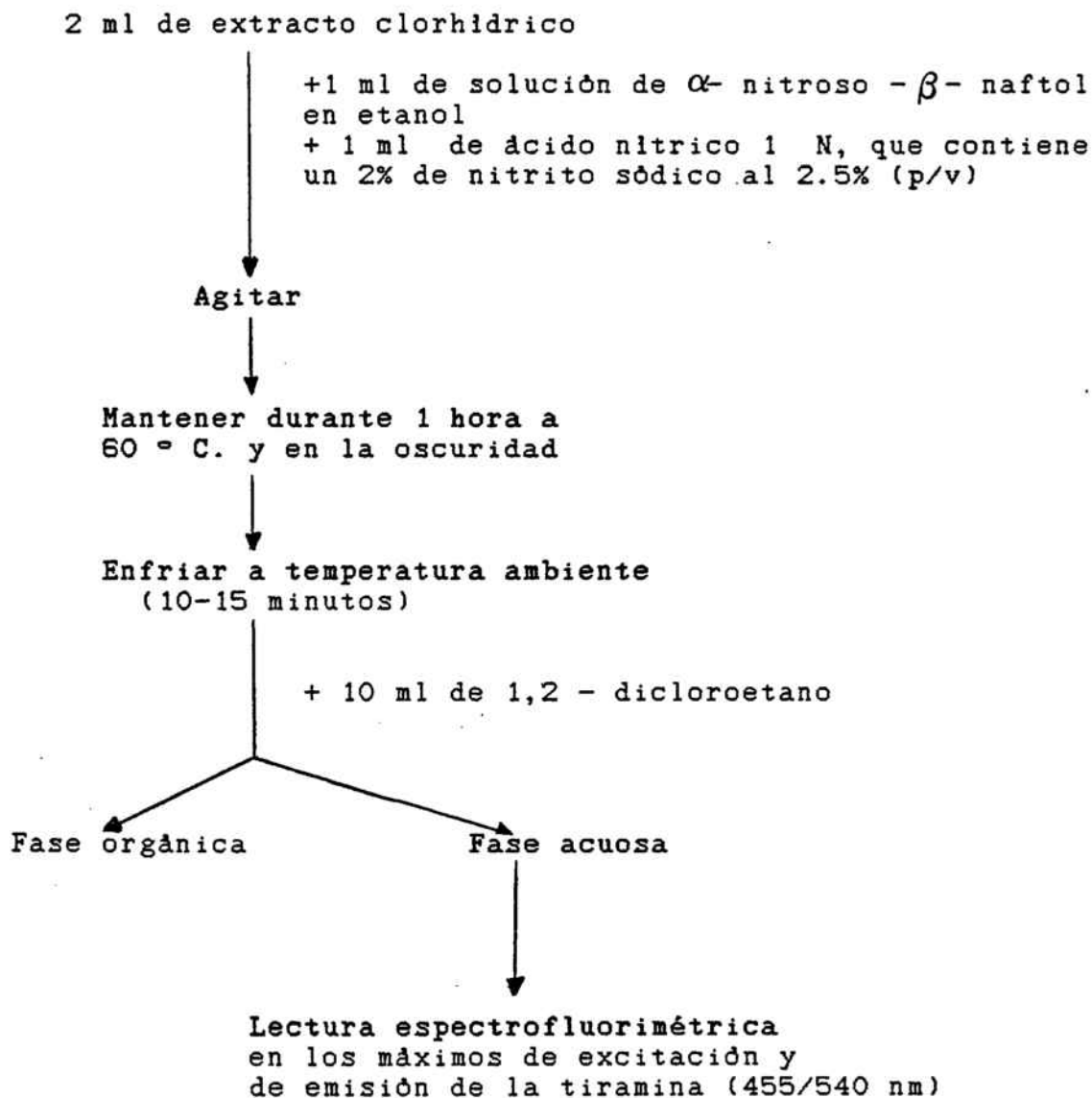


Figura 13 Espectros de excitación y de emisión de una solución patrón de tiramina en HCl 0,2 N.

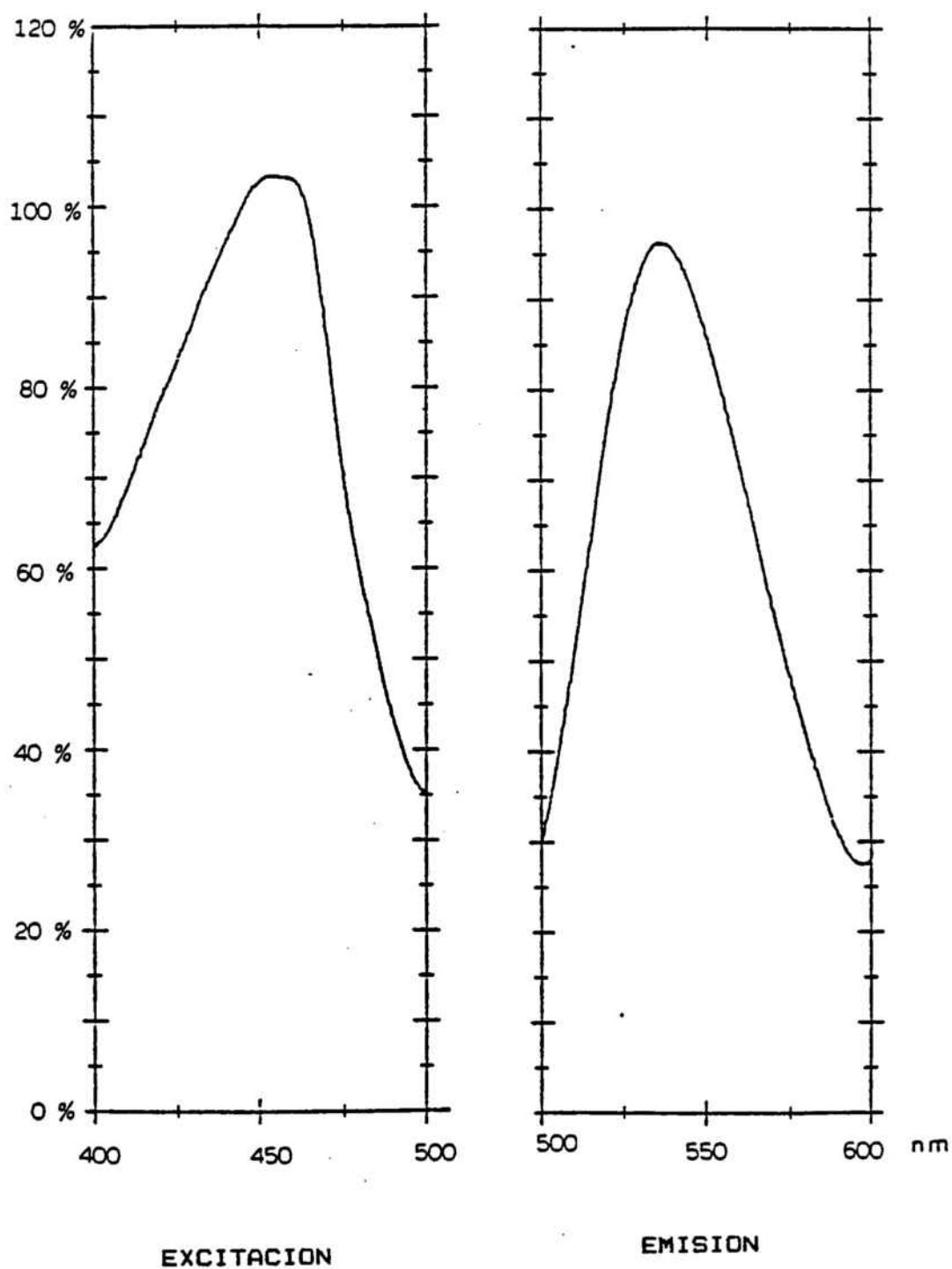
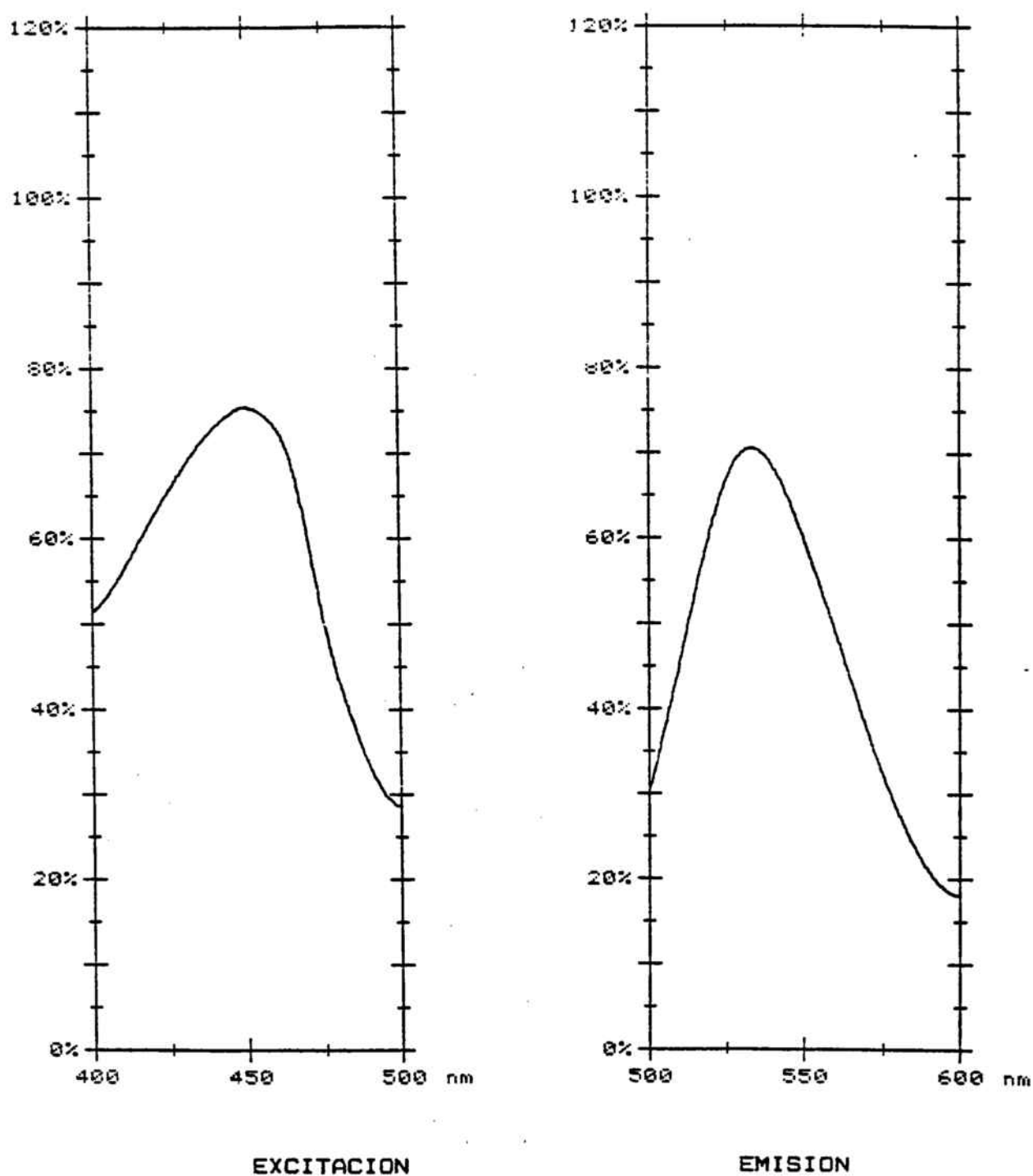


Figura 14 Espectros de excitación y de emisión de la tiramina correspondientes a una muestra de pescado en conserva



6.3 DETERMINACION DE TRIMETILAMINA

Método colorimétrico adoptado por la Association Official of Analytical Chemistry (A.O.A.C., 1984).

Este método es una modificación del método original publicado por Dyer en 1945. Consta en esencia de las siguientes fases:

- Extracción de la trimetilamina de la muestra con ácido tricloroacético
- Alcalinización del extracto y adición de formaldehído para eliminar en lo posible las interferencias debidas a la presencia de dimetilamina
- Extracción con tolueno y posterior secado de la fase orgánica interponiéndola con sulfato sódico anhidro.
- Reacción de la trimetilamina contenida en la fase orgánica con solución de ácido picrico en tolueno para formar un complejo coloreado, cuya intensidad se puede medir espectrofotométricamente a 410 nm.

6.3..1 INSTRUMENTACION Y REACTIVOS

APARATOS:

- Espectrofotómetro UV/VIS Perkin-Elmer modelo 55/S
- Centrifuga Centrónic modelo S-577
- Agitador magnético SBS modelo A-06
- Agitador de tubos Heidolph-Reax modelo 2000

REACTIVOS

- Acido pícrico
- Acido sulfúrico exento de Nitrógeno
- Acido tricloroacético (TCA)
- Carbonato potásico
- Carbonato de magnesio
- Formaldehído del 40%
- Oxido de mercurio exento de Nitrógeno
- Sulfato sódico anhidro exento de Nitrógeno
- Trimetilamina, clorhidrato
- Tolueno

Todos los reactivos utilizados para los que no se especifica la clase fueron de calidad para análisis.

SOLUCIONES:

- Acido clorídrico 0.02 N
- Formaldehído al 20% (agitar 100 ml de formol del 40% con 100g de carbonato magnesico, hasta la total desaparición del color, filtrar y tomar 100 ml que se diluyen hasta 200 ml por adición de agua destilada. Debe trabajarse con precaución)
- Solución de ácido tricloroacético al 7.5%

- Solución de ácido bórico al 4%
- Solución de carbonato potásico (100g/100ml)
- Solución "madre" de ácido picrico al 2% en tolueno
- Solución de trabajo de ácido picrico al 0.02%
- Solución "madre" de patrón de trimetilamina de 1000 ppm: 0.682 g de clorhidrato de trimetilamina + 1 ml de HCl (3+1) y diluir hasta 100 ml con agua destilada. En 5 ml de esta solución se valora su contenido en nitrógeno, para ello se añaden 6 ml de NaOH al 10% se destila y se recoge el destilado sobre 10 ml de ácido bórico al 4% mediante un micro-kjeldalh. Se valora finalmente el destilado con ácido sulfúrico 0.1 N de factor conocido, utilizando como indicador azul de metileno y rojo de metilo (indicador de Tashiro).
- Solución de trabajo patrón de trimetilamina (10ppm=0.01mg/ml): 1 ml de solución "madre" (1000 ppm) + 1 ml HCl(3+1) y diluir hasta 100 ml con agua destilada.

6.3.2. DESCRIPCION DEL METODO

Se pesan 10 g de la muestra problema, previamente triturada y homogeneizada. Se añaden 20 ml de ácido tricloroacético al 7.5% (P/V) y se mezcla con agitación magnética durante 10 min. A continuación se centrifuga a 2000-3000 rpm hasta que el sobrenadante quede prácticamente transparente (aproximadamente 10 minutos). Se filtra y se enrasa el líquido filtrado en un matraz aforado de 25 ml.

Se pipetea una alícuota (de 1.0 a 4.0 ml que debe contener del orden de 0.01-0.03 mg de trimetilamina) y se introduce en un tubo de ensayo donde se diluye hasta 4 ml con agua destilada. Paralelamente se pipetea 1, 2, y 3 ml de la solución de trabajo de patrón de trimetilamina en tres tubos de ensayo respectivamente y se completa también con agua destilada hasta un volumen de 4 ml en cada uno de ellos. Es necesario además trabajar con un blanco, 4 ml de agua destilada.

Se añaden a todos los tubos: 1 ml de formaldehído al 20% (P/V), 10 ml de tolueno y 3 ml de solución de carbonato potásico del 100% (P/V). Se tapan los tubos y se agitan manualmente 40 veces o durante un minuto en el agitador de tubos. Se dejan en reposo y las dos fases se separan.

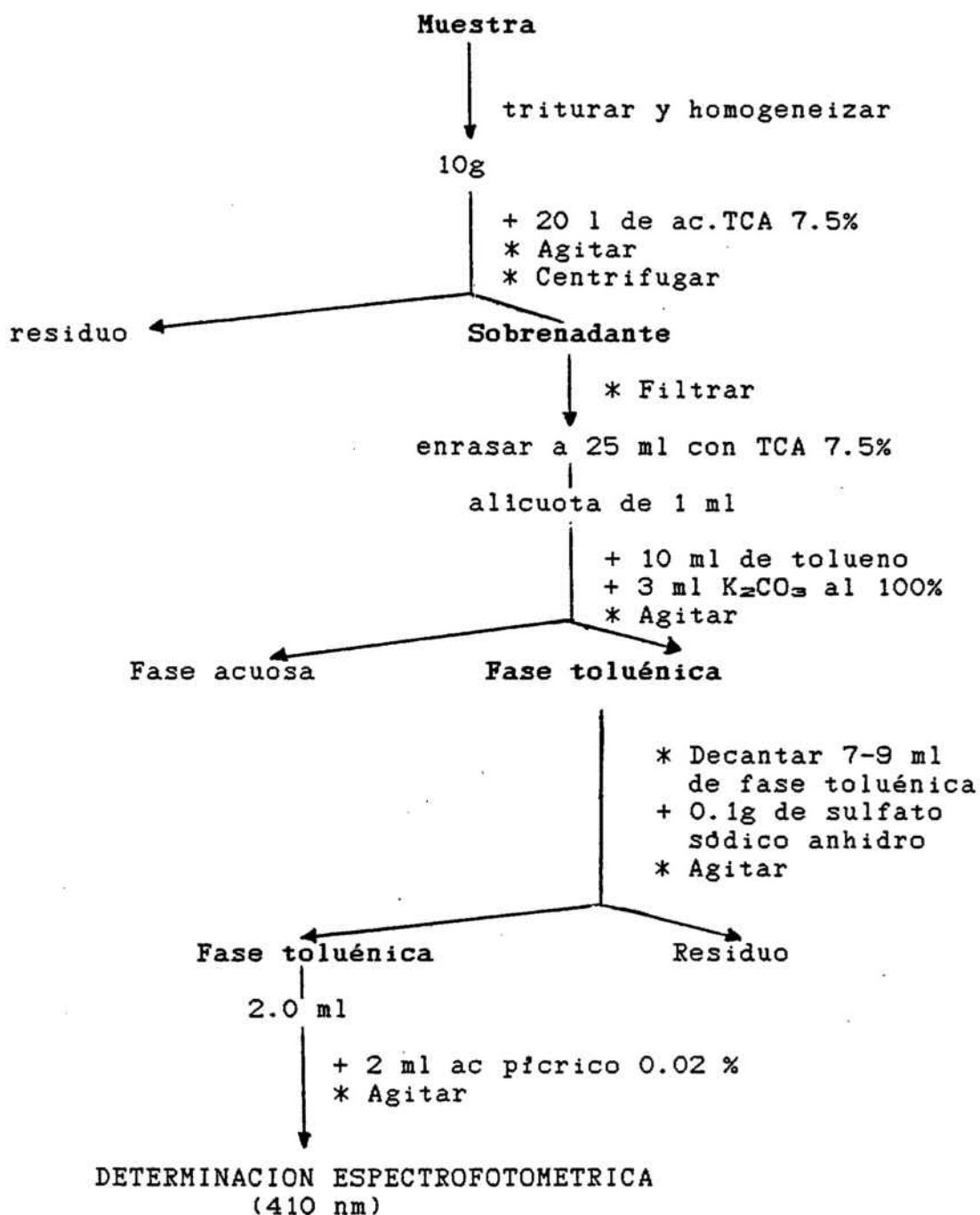
Se toman de 7 a 9 ml de la fase orgánica superior (toluénica) y se trasvasan a otro tubo de ensayo seco, que contenga aproximadamente 0.1 g de sulfato sódico anhidro (en esta operación de trasvase es especialmente importante trabajar con cuidado a fin de no remover y mezclar de nuevo con la fase acuosa inferior). Se tapa el tubo y se agita vigorosamente.

Para formar el complejo coloreado se introducen en cada tubo 2.0 ml de la fase toluénica anhidra y 2.0 ml de la solución de trabajo de ácido picrico en tolueno al 0.02% y se agita bien. El color de esta solución final es estable.

Se determina la absorción a 410 nm después de ajustar el cero del espectrofotómetro con el blanco. Se opera mediante una recta de calibración obtenida, del modo descrito anteriormente, a partir de una solución patrón de trabajo de 10 ppm de trimetilamina. Si la alicuota original contiene más de 0.03 g de trimetilamina es necesario diluir el extracto con ácido tricloroacético y repetir la determinación.

En la figura 15 se incluye un esquema del protocolo seguido.

Figura 15 Esquema del método empleado para la determinación de de TMA (Assoc. Off. Anal. Chem., 1984)



6.4 DETERMINACION DE BASES VOLATILES TOTALES

Método de LUCKE y GEIDEL (1935), modificado por ANTONACOPOULOS (1960) y GALLARDO y col (1979)

Comprende una destilación de las bases volátiles directamente del músculo de pescado, bajo condiciones estandarizadas y en presencia de óxido de magnesio. Esta técnica fue modificada y mejorada por Antonacopoulos, utilizando una unidad de destilación por arrastre en corriente de vapor especialmente diseñada (Fig 16).

Para este trabajo se ha utilizado una variante de esta técnica, propuesta por GALLARDO y col (1979), en la que las bases volátiles no se destilan directamente del músculo del pescado sino que se hace a partir de un extracto tricloroacético, obtenido previamente a partir de éste.

6.4.1 INSTRUMENTACION Y REACTIVOS

APARATOS:

- Centrifuga P-Selecta. Centronic S-577
- Agitador magnético SBS A-06
- Aparato de destilación por arrastre de vapor, según Antonacopoulos

REACTIVOS:

- Oxido de magnesio
- Silicona antiespumante
- Acido bórico al 4%
- Acido clohídrico 0.01 N, exactamente valorado
- Acido tricloroacético al 7.5 %
- Indicador de Tashiro

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad PA

6.4.2 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparación de la muestra y obtención del extracto tricloroacético

Se toman 10 g de la muestra homogenizada, que se tratan con ácido tricloroacético tal como se especifica en el punto 6.3.1 de esta memoria. (puesto que puede utilizarse el mismo extracto para determinar el nitrógeno de trimetilamina y para el nitrógeno correspondiente a bases volátiles totales.

Procedimiento

Se toman 10 ml del extracto tricloroacético y se introducen en el matraz de destilación (A), se diluye con un poco de agua destilada y se añaden 2g de óxido de magnesio (pH=10.6) y unas gotas de silicona antiespumante. Se deja destilar 10 minutos (en este espacio de tiempo el indicador de Tashiro vira de violeta a verde), recogiendo sobre un matraz erlenmeyer que contiene 15 ml de ácido bórico del 4% y el indicador. Una vez finalizado el tiempo de destilación, se retira el matraz de recogida y se coloca otro matraz que contenga bórico e indicador a fin de comprobar que todas las bases volátiles han destilado.

A continuación se valora el contenido del primer erlenmeyer con ácido clorhídrico 0.01 N, que se añade desde una bureta hasta nuevo viraje del indicador.

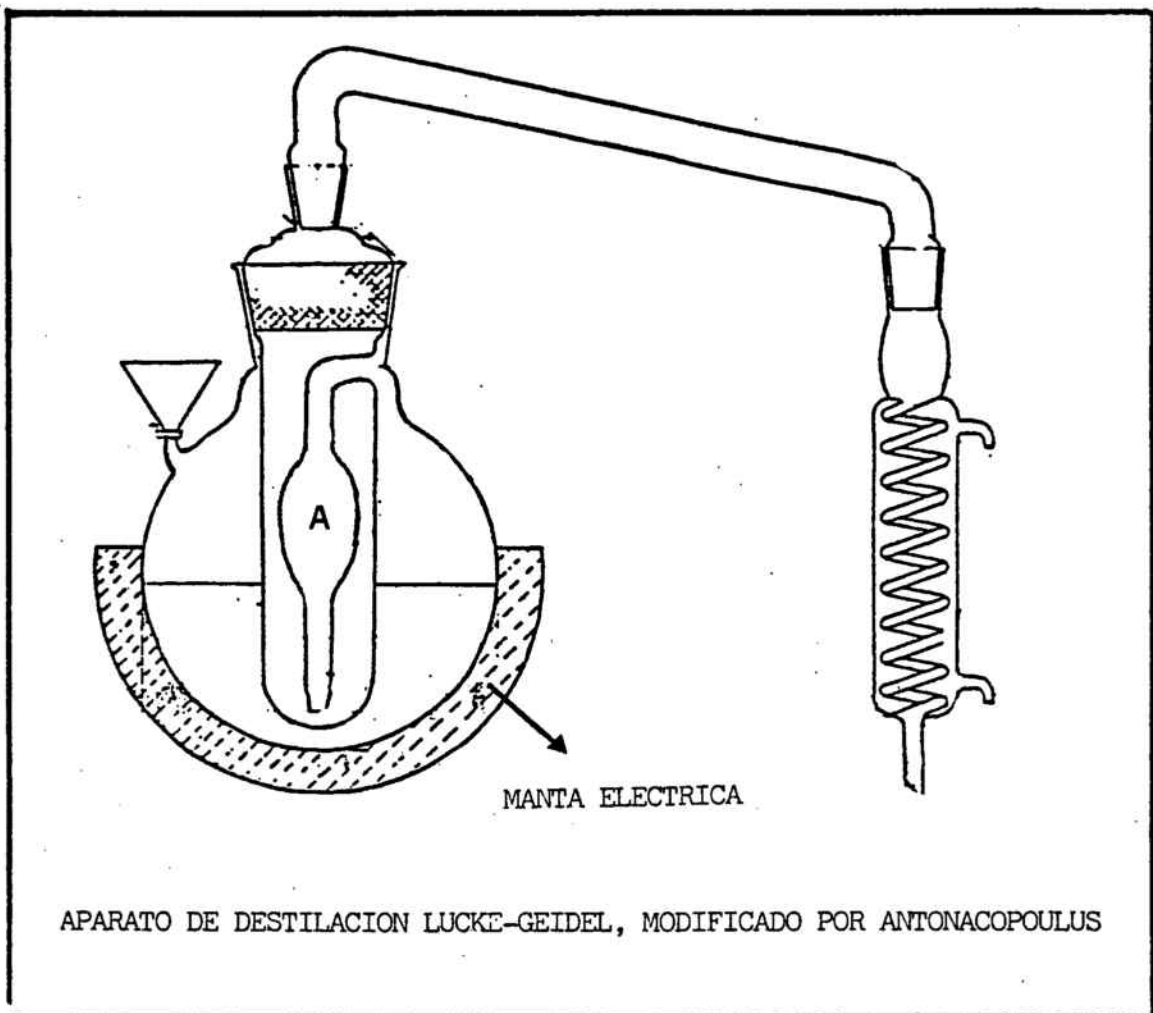
El resultado lo se expresa en partes por millón de nitrógeno de bases volátiles totales (ppm de N-BVT) y se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$N \cdot 14007 \cdot V / P = \text{mg de N-BVT/Kg de muestra o ppm}$$

N = Normalidad del destilado eq./l

V = Volumen del extracto tricloroacético obtenido (25 ml)

P = Peso de muestra en gramos



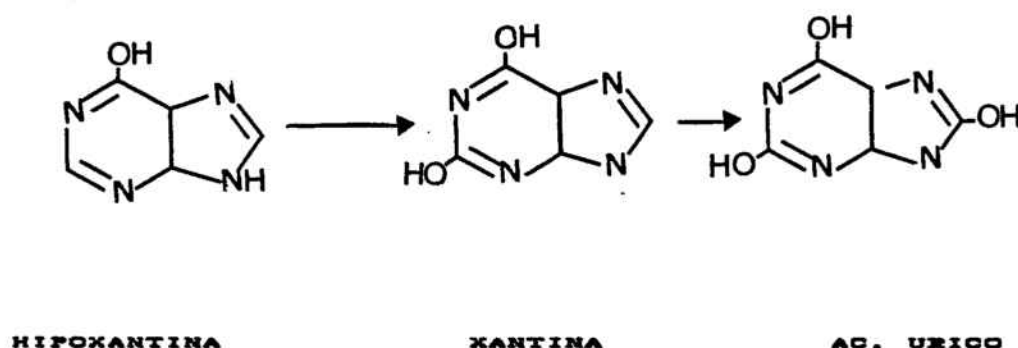
APARATO DE DESTILACION LUCKE-GEIDEL, MODIFICADO POR ANTONACOPOULUS

6.5.- DETERMINACION DE HIPOXANTINA

METODO XANTINA OXIDASA (JONES y MURRAY, 1964)

La hipoxantina se extrae de la muestra por maceración con ácido perclórico, se neutraliza el extracto y se trata con un enzima específico que la oxida a ácido úrico. Este se determina leyendo el máximo de absorción a 290 nm. El mecanismo de esta reacción se muestra en la figura 17-.

Fig. 17 Reaccion de oxidación de la hipoxantina por la xantina-oxidasa



6.5.1. INSTRUMENTACION Y REACTIVOS

APARATOS

- Espectrofotómetro Perkin-Elmer 55/S UV/VIS.
- Centrifuga Centronic S-577.
- Agitador magnético SBS A.06.
- pH-metro digital Crison , mod. 501.

REACTIVOS

- Acido perclórico
- Hidróxido potásico
- Hidróxido sódico
- Bifosfato potásico monobásico (KH_2PO_4)
- Xantina-oxidasa, solución de 20 UI/ml
- Hipoxantina

Todos los reactivos empleados para los que no se especifica la clase, fueron de calidad PA.

SOLUCIONES

- Acido perclórico 0.6 N
- Hidróxido potásico del 30%
- Hidróxido sódico 1 M
- Solución reguladora de fosfatos 0.25M pH=7.6. Se obtiene por disolución de 17,013g de KH_2PO_4 en 250 ml de agua destilada, a los que se añadieron 107 ml de hidróxido sódico 1 M. La mezcla se llevó a 500 ml con agua destilada.
- Solución de xantina-oxidasa, en solución reguladora de fosfatos 0.05 M pH=7.6, preparada por dilución de la solución 0.25 M, hasta alcanzar una concentración de 0.065 UI/ml. Esta solución se prepara diariamente.
- Solución "madre" de 500 ppm de patrón de hipoxantina en solución reguladora de fosfatos 0.25 M, pH=7.6
- Solución de trabajo de 100 ppm de hipoxantina preparada por dilución de un ml de la solución "madre" hasta 100 ml con solución reguladora de fosfatos 0.25 M, pH=7.6

6.5.2 DESCRIPCION DEL METODO

PREPARACION DE LA MUESTRA

Cabe señalar que hay diferencias de contenido de hipoxantina entre tejidos como la piel y el músculo claro y oscuro, lo cual, evidentemente debe tenerse en cuenta en la toma de muestra para el análisis (GALLARDO y MONTEMAYOR, 1982).

En nuestro caso, las muestras estudiadas han sido boquerones cuyo tamaño es pequeño. Por ello se tomaron varias unidades evisceradas y se homogeneizaron con una picadora doméstica. La operación se repitió varias veces para asegurar la homogeneidad.

PROCEDIMIENTO

Obtención de un extracto neutro concentrado en hipoxantina

Se toman unos 10 g de muestra, que se somete a agitación magnética con 25 ml de ácido perclórico 0.6 N frío durante 10 minutos. La cantidad inicial de muestra tomada debe disminuirse a medida que aumenta el contenido en hipoxantina a fin de mantener la lectura espectrofotométrica de la solución final en el tramo de la recta de calibración en que el comportamiento es lineal.

Seguidamente se separan las dos fases por centrifugación (durante 10 minutos a 300 rpm.) y posterior decantación.

Al residuo sólido se le adicionan 20 ml de solución reguladora de fosfatos 0.25 M, para lavar y agotar la muestra. Se agita y se centrifuga de nuevo.

Las dos fases líquidas reunidas (extracto de ácido perclórico 0.6 N y sobrenadante de la fase de lavado) se neutralizan con el volumen necesario de hidróxido potásico del 30%.

Se forma un precipitado blanco de perclorato potásico que se separa por centrifugación (10 minutos a 300 rpm) y filtrado.

La solución transparente obtenida se diluye hasta 150 ml con solución reguladora de fosfatos 0.25 M. El pH final debe estar entre 6.5-7.0

En la figura 18 se muestra un esquema de la pauta seguida.

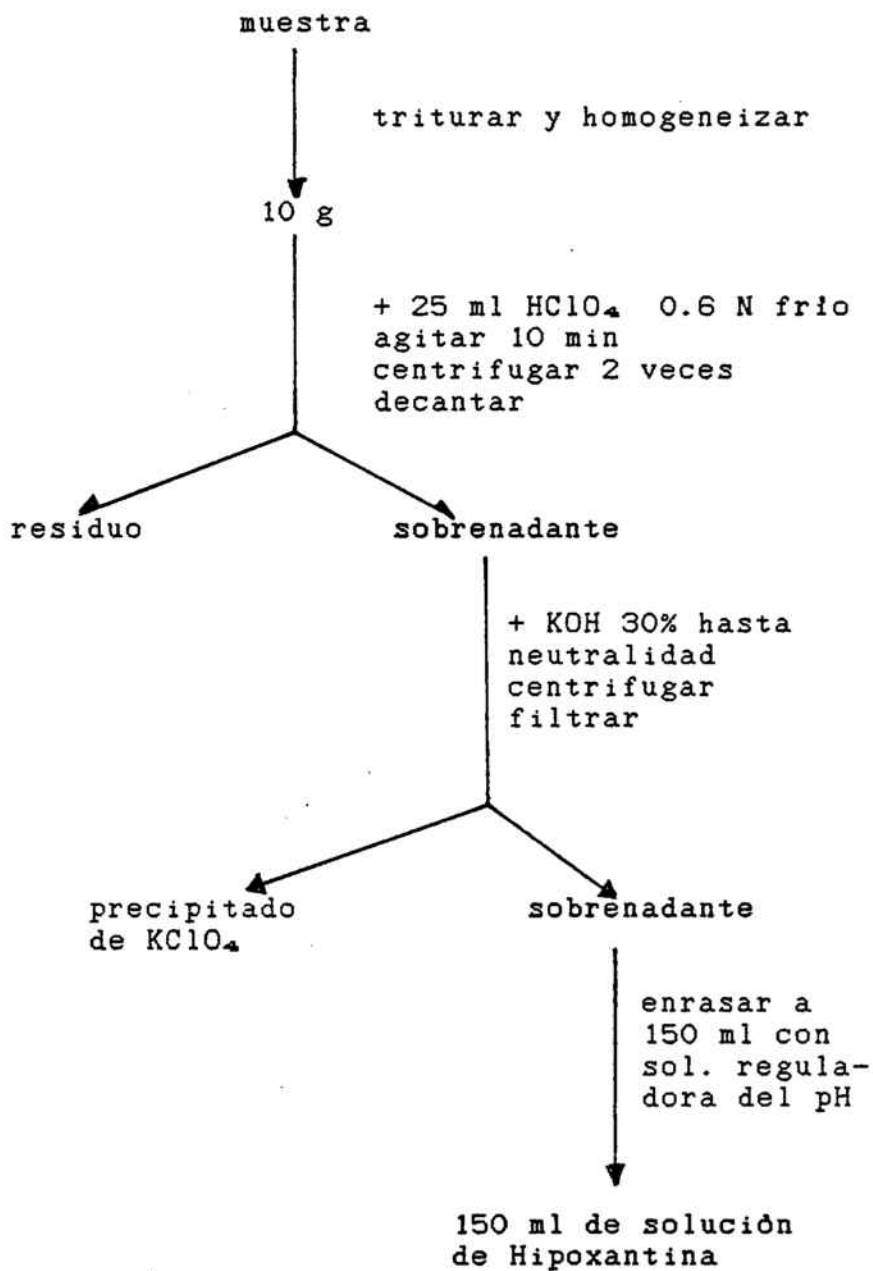
Reacción con la xantina-oxidasa

Se transfiere a un tubo de ensayo 1.0 ml del extracto neutro, y se añade 2.0 ml de agua destilada, 20 ml de solución reguladora de fosfato 0.25 M y 1 ml de solución de xantina-oxidasa 0.065 UI/ml. Se agita e incuba durante 30 minutos a 37 C.

Se mide luego la absorción en el máximo espectrofotométrico de 290 nm.

Los resultados finales se obtienen por comparación con una recta de calibrado elaborada para cada grupo de muestras analizadas simultáneamente. Esta recta se construye a partir de la solución de trabajo de 100 ppm de hipoxantina obteniendo los puntos correspondientes a las siguientes concentraciones de hipoxantina en solución reguladora de fosfatos: 20, 40, 60, 80 y 100 g/ml

Fig. 18.- Extracción de hipoxantina



6.6 DETERMINACION DE pH

Mediante una adaptación del método oficial para la determinación del pH en para productos cárnicos (SANCHIDRIAN, 1984).

Consiste en una maceración de la muestra homogeneizada en forma de pasta con agua destilada neutra y la posterior lectura con un pH-metro.

7.6.1 INSTRUMENTACION Y REACTIVOS

APARATOS

- pH-metro Crison Digit, mod 501
- Agitador magnético SBS A-06
- Granatario. SALTER EB-300

REACTIVOS

- Solución reguladora de pH=4.00
- Solución reguladora de pH=7.02

6.6.2 DESCRIPCION DEL METODO

Preparación de la muestra

Se toma una cantidad de muestra suficiente para ser representativa y se tritura y homogeniza en una picadora doméstica. De la muestra homogeneizada se toman fracciones de unos 2 gramos para hacer la determinación del pH.

Procedimiento

Se calibra el pH-metro a la temperatura de trabajo con las soluciones pH=4.00 y pH=7.02

A los 2 gramos de muestra se añaden 10 ml de agua destilada neutra y el conjunto se somete a agitación magnética durante 10-15 minutos. Se introduce luego el electrodo en la mezcla en reposo, se espera a que se estabilice y se lee el pH.

Para la expresión de resultados es preciso repetir la operación al menos dos veces para en cada muestra.

7.- EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE HISTAMINA Y TIRAMINA EN PESCADOS (BOQUERONES DURANTE SU DETERIORO) Y ESTUDIO DE OTROS PARAMETROS INDICADORES DE ESTE PROCESO.

7.1.- PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Se ha realizado un estudio para conocer como evoluciona el contenido de aminas biógenas en boquerones durante su deterioro. Para ello se realizaron ensayos "de descomposición forzada" dejando el pescado a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo corto y, en paralelo, se realizó también una prueba similar pero manteniendo el producto a una temperatura de refrigeración de 4 grados centígrados.

En total, se realizaron dos ensayos a temperatura ambiente y dos a temperatura de refrigeración.

Además de la determinación de aminas biógenas (histamina y tiramina) durante este proceso se estudió también la evolución de los contenidos de otras sustancias, clásicamente utilizadas como parámetros químicos indicadores del grado de deterioro del pescado. Concretamente, se determinaron, trimetilamina y bases volátiles que son dos indicadores químicos estrechamente relacionados con la actividad bacteriana; igualmente se cuantificaron los aumentos en el contenido de hipoxantina, producto de degradación del ATP y de compuestos relacionados con él, cuya aparición es debida a los cambios enzimáticos previos a la colonización bacteriana. También se efectuaron medidas del pH. que aumenta durante la descomposición del músculo de pescado debido sobre todo a la formación de metabolitos básicos (trimetilamina, dimetilamina ...).

Se ha trabajado con boquerones adquiridos a primera hora de la mañana en un mercado de la ciudad en donde eran mantenidos en hielo. No conocemos con exactitud la procedencia de este pescado, pero sabemos que se trataba de pescado de la costa norte de Cataluña y asimismo tampoco podíamos conocer el tiempo transcurrido tras su captura. En cualquier caso, en las muestras de partida el examen organoléptico fue satisfactorio y los contenidos de los parámetros químicos del deterioro fueron bajos.

El pescado se trasladó al laboratorio manteniendo las condiciones de refrigeración e inmediatamente se procedió a su limpieza y evisceración (operación previa a cualquier otra en los procesos de elaboración en productos de la pesca).

Se ha considerado como tiempo 0 del ensayo, al momento de la adquisición del pescado existiendo como es lógico un retraso entre este tiempo y el del primer análisis (correspondiente al traslado y acondicionamiento de la muestra).

El pescado limpio y eviscerado fue triturado y homogeneizado varias veces en una picadora doméstica. Aunque con la trituración se acelera la descomposición del pescado, este paso no puede ser obviado puesto que de lo contrario no estaría garantizada la homogeneidad de la muestra, ya que pueden existir variaciones interindividuales e incluso entre las distintas partes del pescado.

En ambos ensayos se calculó previamente la cantidad de muestra necesaria para efectuar un número representativo de determinaciones a lo largo del tiempo. Se homogeneizó al mismo tiempo la cantidad necesaria de muestra para todos los análisis. Estos se efectuaron con una periodicidad preestablecida: de 3 a 5 horas en los ensayos a temperatura ambiente y cada 12 horas en los ensayos a 4 grados centígrados.

7.2.- RESULTADOS

A continuación, en las tablas 13, 14, 15 y 16 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos.

Las tablas de resultados recogen la evolución de la histamina y de la tiramina, así como la de otros parámetros estudiados: TMA, TVB, hipoxantina y pH. En la primera columna se señala el tiempo en horas, transcurrido desde la adquisición de las muestras.

7.3.- DISCUSION

En primer lugar y a la vista de los resultados obtenidos, cabe señalar que en todos los casos tal como era de esperar, se observaron aumentos importantes en los contenidos de los indicadores químicos estudiados. Del mismo modo se observa también la tendencia del pH a aumentar durante el periodo del tiempo en que se ha seguido el proceso de descomposición del boquerón (43 y 36 horas en el estudio a temperatura ambiente y 73 y 143 a 4 grados centígrados, para el primer y segundo ensayo respectivamente).

Primer ensayo.

En el primer ensayo que se realizó en el mes de mayo, se observó que además de existir un aumento en los contenidos de histamina y tiramina a temperatura ambiente (24-26 grados), esta evolución sigue un perfil semejante para ambas aminas (fig. 19). Se observó en primer lugar que el contenido de estas aminas, empezaba a aumentar entre las 9 y las 13 horas y que en ambos casos los mayores incrementos se producían entre las 11 y las 24 horas.

Los contenidos de estas dos aminas, son bajos en la muestra inicial (5 ppm de histamina y "nd" de tiramina); la diferencia de contenido entre ambas aminas se agudizó durante el periodo de estudio, mientras para la histamina se alcanzaron niveles de hasta 3471 ppm, el contenido en tiramina se mantuvo, después del aumento experimentado entre las 9 y las 24 horas, alrededor de las 1000 ppm (el contenido de histamina llega a ser más de 30 veces superior al de tiramina).

También en la figura 19 se muestra gráficamente la evolución de estas dos aminas en el ensayo que se efectuó de modo paralelo, pero manteniendo la muestra a una temperatura de 4 grados centígrados durante 37 horas. A esta temperatura los contenidos de histamina y de tiramina también aumentaron, aunque el grado de aumento y su perfil de evolución, fueron distintos a los presentados a temperatura ambiente. Se observó que el contenido de histamina, aumentó de forma importante entre las 49 y las 73 horas. El contenido en tiramina, lo hizo un poco más tarde.

Los contenidos de ambas aminas se mantuvieron bajos, menores a 6 ppm, durante un periodo de tiempo del orden de 48 horas. No obstante, al cabo de 72 horas (3 días) de mantener la muestra en el frigorífico, el contenido de histamina llegó a 100 ppm, mientras que de tiramina se alcanzaron sólo 50 ppm.

El perfil de evolución de los contenidos de TMA se muestra también en la figura 19 juntamente con el de histamina y tiramina. Se parte como en el caso de las aminas no volátiles de contenidos especiales, ya que concretamente, no se detectó trimetilamina en pescado fresco.

El aumento brusco de este parámetro tuvo lugar a partir de las 20 horas, a temperatura ambiente, observándose en consecuencia que existe un cierto retraso con respecto a los aumentos de histamina y tiramina.

En el ensayo a 4 grados los contenidos de trimetilamina se mantuvieron muy bajos, como mínimo, hasta las 49 horas. A partir de este momento aumentaron de un modo similar a las aminas biógenas.

En cuanto a los contenidos de trimetilamina, tanto en el ensayo a temperatura ambiente como en el ensayo a 4 grados se mantienen por encima de los niveles de tiramina.

En cuanto a la histamina, su comportamiento fue distinto según la temperatura. Así, en el ensayo a temperatura ambiente, el contenido de histamina superaba al de TMA, mientras que en ensayo a 4 grados el contenido de TMA fue superior al de las aminas biógenas (histamina y tiramina).

En el ensayo a temperatura ambiente se alcanzaron, al cabo de 43 horas, valores del orden de 200 ppm, mientras que a temperatura de refrigeración, al cabo de 73 horas, se habían alcanzado niveles de 100 ppm de TMA.

El contenido de hipoxantina en la muestra de partida fue más alto que el de las aminas biógenas. Esta circunstancia es fácilmente explicable puesto que la hipoxantina es un parámetro indicativo de la actividad enzimática que se inicia tras la muerte del animal, independientemente de que exista o no proliferación bacteriana.

Sin embargo, JONES y col. (1964) comprobaron que su contenido aumentaba mucho más rápidamente a partir de la colonización bacteriana. El contenido inicial de hipoxantina, en la muestra fue de 267 ppm (1.54 microgramos)) y a las 43 horas de almacenamiento a temperatura ambiente se alcanzaron las 3365 ppm. Como es lógico, al igual que para otros parámetros en el ensayo a 4 grados, los contenidos de hipoxantina se mantuvieron siempre considerablemente más bajos que a temperatura ambiente, alcanzándose 926 ppm a las 61 horas de almacenamiento.

Comparando el perfil de evolución de los contenidos de hipoxantina (fig. 20 con los de histamina y tiramina (fig. 19) se observa también un cierto paralelismo. Aunque la hipoxantina empieza a aumentar antes por la circunstancia antes señalada de su origen autolítico, en el ensayo a temperatura ambiente hasta las 9 horas el aumento es relativamente bajo desde 267 ppm iniciales hasta 585 ppm en este tiempo. Entre las 9 y las 14 horas tiene lugar el aumento brusco de hipoxantina, y recordemos que también durante este tiempo se producen aumentos de aminas biógenas.

En el ensayo a 4 grados centígrados también se observó un aumento relativamente poco importante de hipoxantina en las primeras 49 horas de observación (de 267 a 768 ppm), siendo a partir de este tiempo cuando realmente el aumento es más pronunciado. También en este caso coincide su aumento con el de las aminas biógenas, ya que éstas también aumenta de modo apreciable a partir de las 48 horas.

La evolución del pH se representa gráficamente en la figura 20. En el ensayo a temperatura ambiente los incrementos importantes en el pH se observaron con un cierto retraso a los de histamina, tiramina, trimetilamina e hipoxantina. En el ensayo a 4 grados no se observó aumento significativo de este parámetro en las 73 horas de estudio, durante este tiempo sólo se observó un aumento de 0.1 unidades de pH.

El pH inicial en la muestra de partida fue de 6.14; es un pH más alto que el de la carne de mamífero pero que es normal en pescados, puesto que en sus reservas glucolíticas y el descenso "post-mortem" debido a la glucolisis anaerobia tiene poca importancia.

Segundo ensayo

En la segunda experiencia, realizada también siguiendno en paralelo la descomposición del boquerón a temperatura ambiente (26-28 grados en este caso) y a 4 grados centígrados, se determinaron además de los parámetros anteriormente citados (histamina, tiramina, trimetilamina, hipoxantina y pH) los contenidos de bases volátiles totales.

En este segundo ensayo se acortó el tiempo de estudio a temperatura ambiente (36 horas) puesto que los aumentos importantes de todos los parámetros estudiados tenían lugar entre las 9 y las 24 horas, y por el contrario se prolongó el tiempo de estudio en el ensayo a 4 grados centígrados (144 horas = 6 días), ya que con el tiempo considerado en el primer ensayo sólo se efectuaron dos tomas de muestra después de que empezaran aumentar los contenidos de los parámetros estudiados.

En esta segunda experiencia los aumentos importantes de histamina y tiramina a temperatura ambiente se produjeron también a partir de las 9 horas, como se muestra en la figura 21. Ambas aminas experimentaron un aumento brusco entre las 8 y las 24 horas, de modo semejante a lo que había sucedido en el primer ensayo.

En cuanto a los niveles obtenidos, partiéndose también de niveles bajos de ambas aminas (0.6 ppm de histamina y 0.1 ppm de tiramina) los contenidos de tiramina a las 36 horas estaban muy por debajo de los de histamina (situación que se daba en el primer ensayo).

Sin embargo, el nivel final alcanzado por los contenidos de tiramina fue más alto que en la primera experiencia llegándose a las 721 ppm a las 36 horas, frente a las 100 ppm que se alcanzaron en el primer ensayo, en este mismo tiempo.

Los contenidos de histamina a las 36 horas a temperatura ambiente tampoco coinciden, pero en este caso las diferencias son menos importantes, mientras que en el primer caso se encontraban del orden de 2900 ppm, en el segundo se alcanzaron alrededor de 2200 ppm.

En el ensayo a 4 grados centígrados (fig 22), a las 48 horas se había producido un aumento en el contenido de ambas aminas. Estos incrementos aparecieron de modo más precoz en nuestra primera experiencia (donde lo hicieron a partir de las 48 horas). No obstante los niveles alcanzados a las 48 horas eran relativamente bajos y el aumento más importante se partió de este tiempo sobre todo en cuanto a histamina.

Aunque el estudio se prolongó hasta 114 horas (6 días), tampoco se alcanzaron niveles tan altos como los obtenidos a temperatura ambiente en periodos de tiempo mucho más cortos.

El nivel más alto que alcanzó la histamina fue de 754 ppm, mientras que el contenido en tiramina llegó hasta alrededor de 240 ppm.

Al igual que en el primer ensayo, tanto a temperatura ambiente como en recuperación se obtuvieron contenidos más elevados de histamina que de tiramina.

En cuanto al estudio de comportamiento de la hipoxantina durante el segundo ensayo (fig. 22) destacaremos en primer lugar que se partió de un valor inicial sensiblemente más alto que en el primer ensayo, pero el aumento brusco de los contenidos de este compuesto apareció también entre las 8 y las 12 horas a temperatura ambiente (al mismo tiempo que las aminas biógenas).

En la experiencia a 4 grados centígrados el aumento de hipoxantina, fue, en este caso, más tardío que el de las aminas biógenas.

Los niveles de hipoxantina que se determinaron fueron semejantes a los del primer ensayo: alrededor de 2300-2500 ppm a temperatura ambiente a las 36 horas y más de 900 ppm a las 61 horas a 4 grados centígrados.

El comportamiento en cuanto a las variaciones de pH durante el proceso (fig. 22) fue algo distinto al del primer ensayo. A temperatura ambiente, el aumento del valor de este parámetro se observó a partir de las 15 horas al igual que en el primer ensayo.

La diferencia entre ambas experiencias estriba en que en el primer ensayo el aumento de pH entre las 15 y las 30 horas fue bajo, de 6.23 a 6.71 mientras que en el segundo ensayo se produjo un aumento superior en este mismo intervalo de tiempo.

A 4 grados centígrados se observó que el aumento de pH se daba a partir de las 72 horas de almacenamiento, lo cual coincide perfectamente con los resultados obtenidos en el primer ensayo a esta temperatura, ya que no se habían apreciado aumentos significativos en el pH sobre todo en el periodo de estudio (que fue de 73 horas).

En el perfil de evolución de los contenidos de trimetilamina (fig. 24) se puede observar que el contenido de este compuesto a temperatura ambiente reveló un primer aumento a las 9 horas, si bien, el nivel alcanzado en este tiempo fue relativamente bajo, 47.2 ppm, mientras que sólo al cabo de 2 horas después (11 horas) fue de 138 ppm. Así pues, también en este caso prácticamente coinciden el inicio de la formación de trimetilamina y el inicio de la formación de aminas biógenas.

Los contenidos de trimetilamina a lo largo de este segundo ensayo fueron superiores a los de tiramina e inferiores a los de histamina (lo mismo había sucedido en nuestro primer ensayo).

En un estudio semejante (COGUL, 1987) en el que también se mantuvo el boquerón a temperatura ambiente durante el mismo periodo de tiempo (36 horas), si bien sólo se estudiaba la tiramina y la trimetilamina, los niveles finales alcanzados en ambos parámetros fueron inferiores a los hallados en este trabajo.

A temperatura controlada de 4 grados centígrados el aumento significativo de trimetilamina fue observado a partir de las 36 horas. Al igual que en la prueba a temperatura ambiente a 4 grados, se produjo un adelanto en el tiempo en que empezaba a aumentar la trimetilamina

respecto al primer ensayo y respecto a la formación de aminas biógenas. No obstante, a esta temperatura de refrigeración las cantidades de trimetilamina empiezan a ser realmente elevadas alrededor de las 48 horas.

Paralelamente a los anteriores parámetros se estudió también en este segundo ensayo el comportamiento de las "bases volátiles totales" (fig.23). Bajo este nombre se incluyen además de la trimetilamina a otros compuestos volátiles que destilan en medio alcalino.

Los niveles de bases volátiles totales fueron más elevados, lógicamente que los de trimetilamina, y su aumento tanto a temperatura ambiente como a 4 grados mostró un perfil paralelo al de la trimetilamina.

En resumen: en ambas experiencias se observaron incrementos considerables de histamina y tiramina entre las 9 y las 24 horas a temperatura ambiente.

En este mismo periodo de tiempo se produjeron también los aumentos importantes de los demás parámetros químicos estudiados, con la excepción, quizás, del pH cuyo aumento parece presentar un cierto retraso.

A cuatro grados centígrados los aumentos en el contenido de aminas biógenas se observaron en un periodo de tiempo entre las 36 y 48 horas.

El incremento de aminas a esta temperatura baja, puede explicarse puesto que determinados microorganismos mesófilos como Klebsiella pneumoniae y Clostridium perfringens pueden mantener a 4 grados centígrados, su actividad aminoácido descarboxilásica. Aunque a esta temperatura, no se multipliquen (Baranowski y col., en PAN y JAMES, 1985).

De ellos se deduce que si se rompe en algún punto la cadena de frío utilizada normalmente para conservar los productos pesqueros y estos microorganismos se multiplican, aunque luego se mantengan las temperaturas bajas, la capacidad formadora de aminas biógenas permanece.

Además según la bibliografía existen microorganismos psicrófilos con actividad aminoácido descarboxilásica como Citrobacter freundii que además de psicrófilo es hálófilo (FRANK y col, 1985)(respecto a este microorganismo habrá que prestar especial interés en el caso de productos mantenidos en salazón y refrigeración como en el caso de las semiconservas de anchoa.

Dado que uno de los objetivos de esta tesina era estudiar la validez de las aminas biógenas como indicadores del grado de deterioro del pescado (concretamente en este caso de boqueron), se ha realizado finalmente un estudio de correlación entre la evolución de estas aminas y la de otros parámetros estudiados (trimetilamina, hipoxantina, bases volátiles totales y pH) que de alguna manera son los parámetros que clásicamente se utilizan para conocer el grado de frescura de estos productos.

Así se calculó el coeficiente de correlación entre la histamina y la tiramina a temperatura ambiente y a 4 grados centígrados y los citados parámetros analíticos. Esta correlación resultó muy significativa en la mayoría de los casos como se muestra en las tablas 17 y 18, en las que además del coeficiente de correlación (r) también figuran los correspondientes grados de significación (P).

En definitiva, consideramos que en base a los resultados obtenidos en este estudio queda en principio demostrada la posibilidad de utilizar las aminas biógenas como indicadores del grado de deterioro de boquerones. Para poder extrapolar esta utilidad a otros tipos de pescados sería necesario plantear en los mismos, estudios similares al que es objeto de esta memoria, ya que pueden existir diferencias en función del tipo de producto al igual que pueden existir variaciones dentro de un mismo tipo en función de los factores estacionales, del modo de captura, etc. Estos inconvenientes, no obstante, se reproducen igualmente en otros de los parámetros de frescura considerados y ello hace que sea muy difícil establecer unos límites estrictos de contenidos que permitan definir una determinada calidad del pescado. Para estudiar esta posibilidad obviamente serán necesarios estudios posteriores que contemplen al menos todas las variables señaladas.

Tabla 13 Evolución de Histamina, Tiramina, Trimetilamina, hipoxantina y pH a lo largo de la descomposición de boquerón (Engraulis encrasicolus) mantenido a temperatura ambiente (primer ensayo).

TIEMPO (horas)	HISTAMINA (ppm)	TIRAMINA (ppm)	TMA ¹	HIPOXAN ²	pH
2	5.1	nd ³	0.2	267	6.14
5	7.0	0.2	7.5	366	6.20
9	7.3	0.8	8.2	585	6.21
13	6.3	nd	-	-	6.21
15	24.3	1.2	5.0	1085	6.23
20	296.9	24.4	96.3	1874	6.28
24	1770.0	46.7	126.1	-	6.67
27	2476.0	76.3	177.8	2017	6.63
30	2609.0	59.3	-	2120	6.71
33	2937.0	80.4	174.1	1996	6.60
36	2962.0	96.9	203.7	2271	6.63
39	3371.0	77.5	195.3	2351	6.74
43	3471.0	76.0	215.7	3365	6.89

Tabla 14 Evolución de Histamina, Tiramina, Trimetilamina, Hipoxantina y pH a lo largo de la descomposición de boquerón (Engraulis encrasicolus) mantenido a 4°C (1er ensayo).

TIEMPO (horas)	HISTAMINA (ppm)	TIRAMINA (ppm)	TMA ¹	HIPOXAN ²	pH
0	5.1	nd ³	nd	267	6.14
13	4.7	0.04	nd	376.9	6.17
26	6.5	0.40	nd	409.0	6.16
37	7.0	0.35	nd	756.6	6.22
49	2.7	0.50	nd	768.9	6.30
61	65.5	12.85	64.63	926.4	6.29
73	107.78	53.3	104.47	-	6.30

(1): TRIMETILAMINA
(2): HIPOXANTINA
(3): no detectado

Tabla 15 Evolución de Histamina, Tiramina, Trimetilamina, Bases Volátiles Totales, Hipoxantina y pH a lo largo de la descomposición de boquerón (Engrauli encrasicholus) mantenido a T ambiente. (2º ensayo)

TIEMPO ¹	HISTAMINA	TIRAMINA	TMA ²	BVT ³	HIPOXAN ⁴	pH
2	0.6	0.1	3.8	126	483	6.11
5	1.2	0.3	5.9	-	586	6.11
9	4.2	4.1	42.7	259	617	6.19
11	92.0	175.0	138.0	380	1273	6.08
15	217.0	250.0	189.0	431	1367	6.15
20	683.0	328.0	218.0	700	1522	6.36
24	1365.0	325.0	254.0	1190	-	6.53
27	2025.0	453.0	399.0	1636	1869	6.63
30	1823.0	469.0	392.0	2271	2352	6.94
33	2194.0	592.0	403.0	2312	2549	6.98
36	2233.0	721.0	548.0	2511	2453	7.03

Tabla 16 Evolución de Histamina, Tiramina, Trimetilamina, Bases Volátiles Totales, Hipoxantina y pH a lo largo de la descomposición de boquerón (Engrauli encrasicholus) mantenido a 4°C. (2º ensayo).

TIEMPO ¹	HISTAMINA	TIRAMINA	TMA ²	BVT ³	HIPOXAN ⁴	pH
2	0.6	0.1	3.8	126	483	6.11
12	2.8	0.7	10.6	222	527	6.01
24	3.9	0.9	17.9	355	666	6.10
36	5.8	2.9	64.2	406	793	6.12
48	37.1	104.0	187.0	604	635	6.14
60	88.0	153.0	230.0	1015	820	6.05
72	287.0	165.0	292.0	1234	1227	6.05
86	370.0	198.0	237.0	1275	1263	6.20
97	544.0	162.0	241.0	1367	1397	6.24
10	588.0	173.0	239.0	1328	-	6.54
19	754.0	178.0	281.0	1113	1558	6.50
31	677.0	207.0	-	1153	1930	6.73
43	633	240.0	246.0	1228	1813	6.69

(1): en HORAS

(2): TRIMETILAMINA

(3): BASES VOLATILES TOTALES

(4): HIPOXANTINA

Figura 19. Evolución de los contenidos de histamina tiramina y trimetilamina durante la descomposición de boqueron , a temperatura ambiente y a 4° (Primer ensayo)

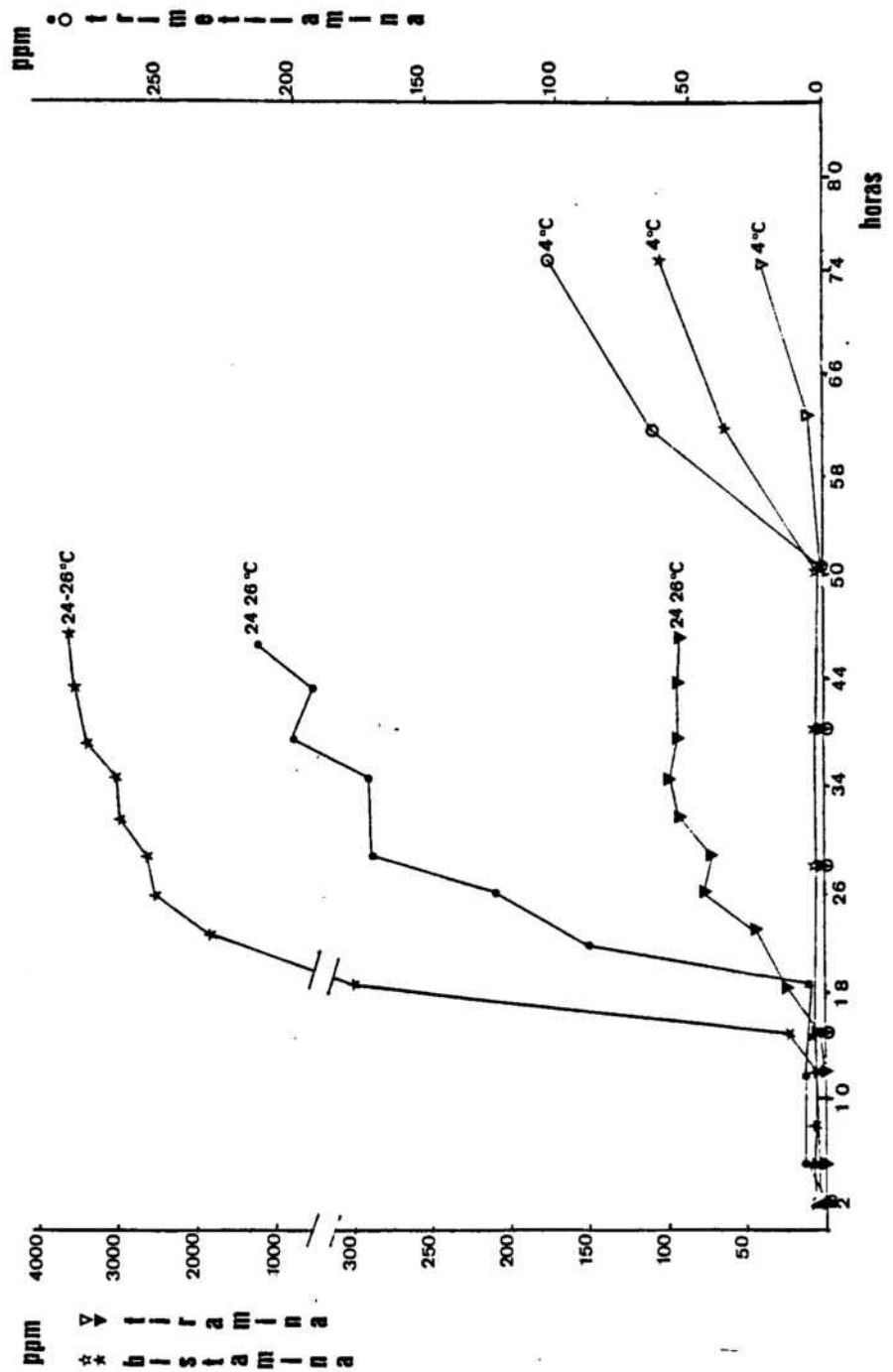


Figura 20 .Evolución de los contenidos de hipoxantina y del pH durante la descomposición del boquerón, a temperatura ambiente y a 4° (primer ensayo)

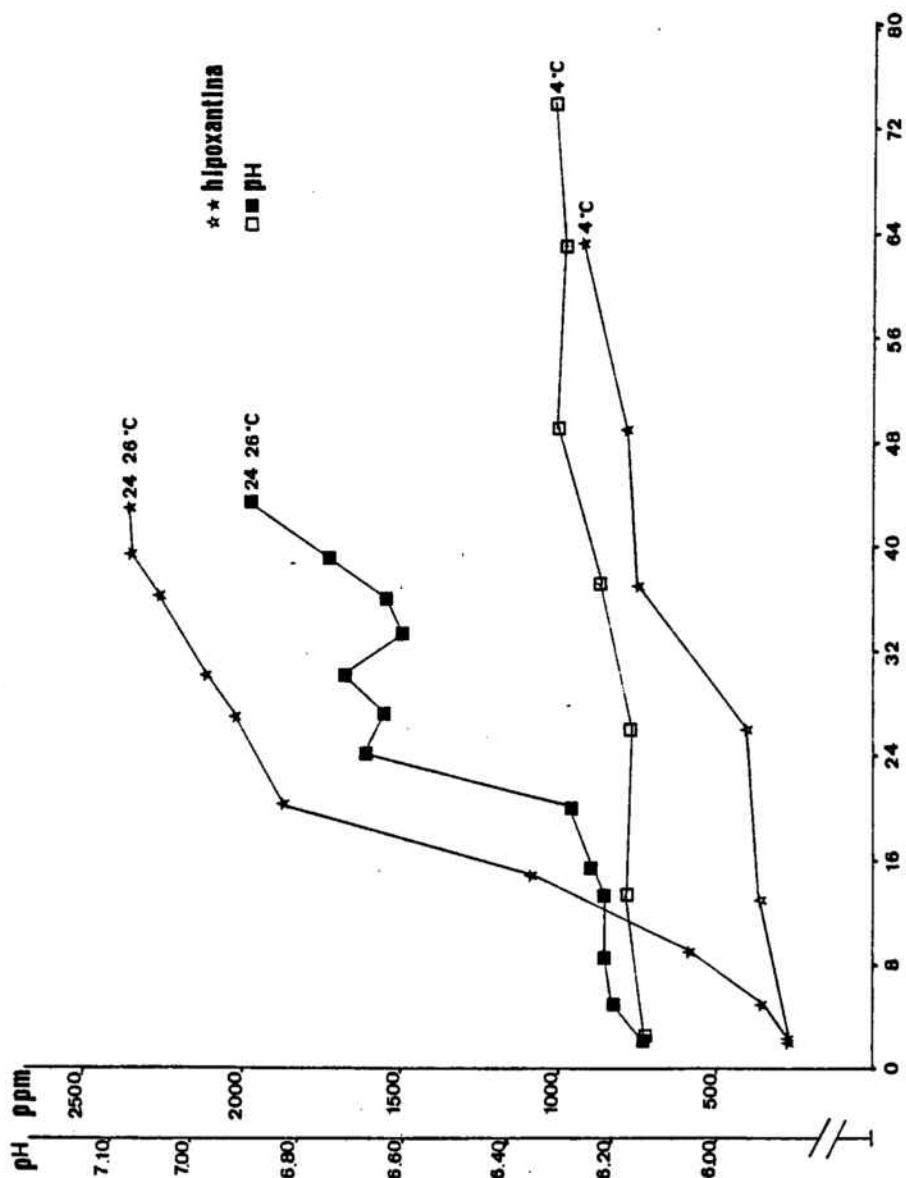


Figura 21. Evolución de los contenidos de histamina y de tiramina durante la descomposición del boquerón a temperatura ambiente y a 4° (segundo ensayo).

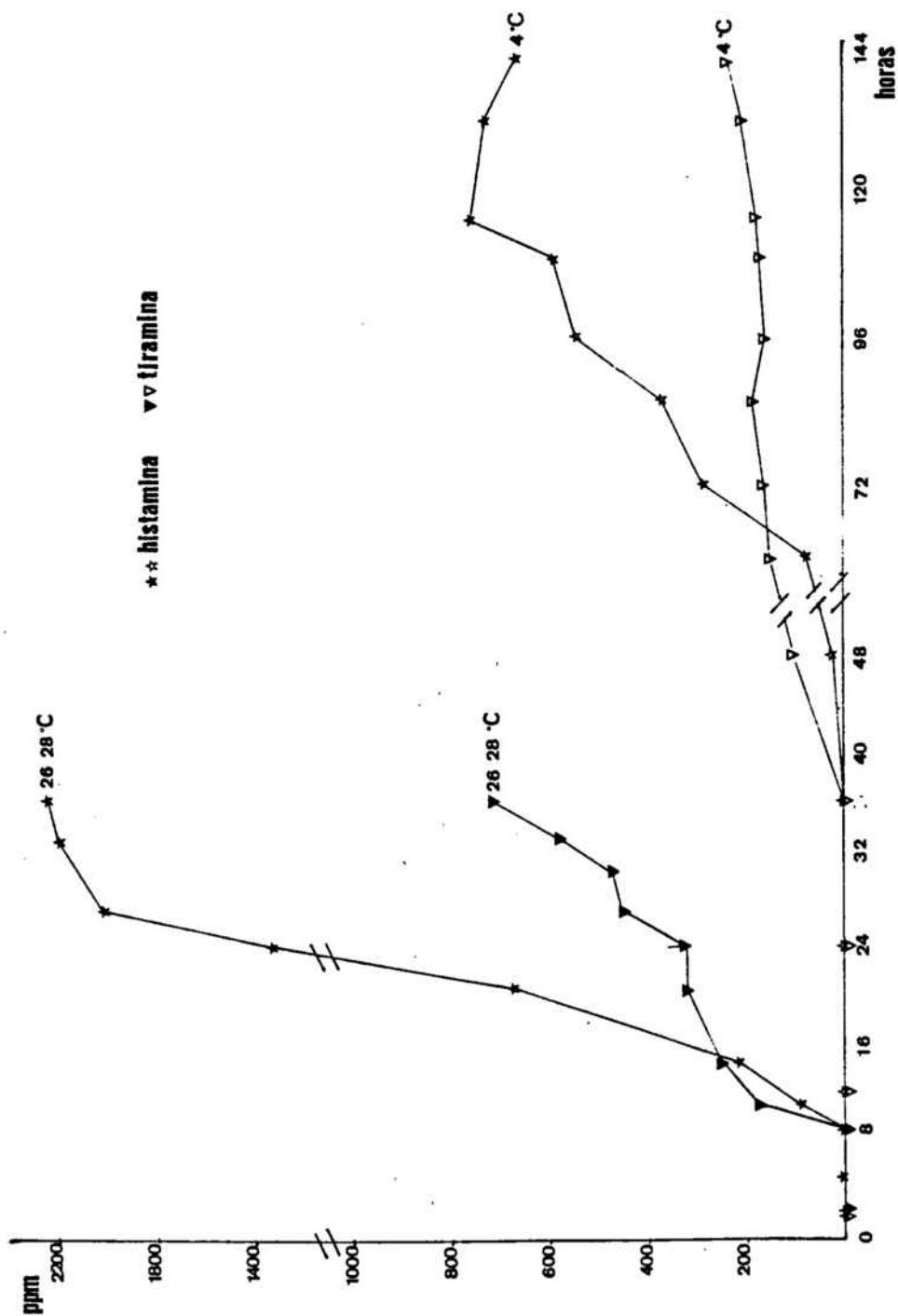


Figura 22. Evolución de los contenidos de hipoxantina y del pH en la descomposición del boquerón a temperatura ambiente y a 4 °C (segundo ensayo).

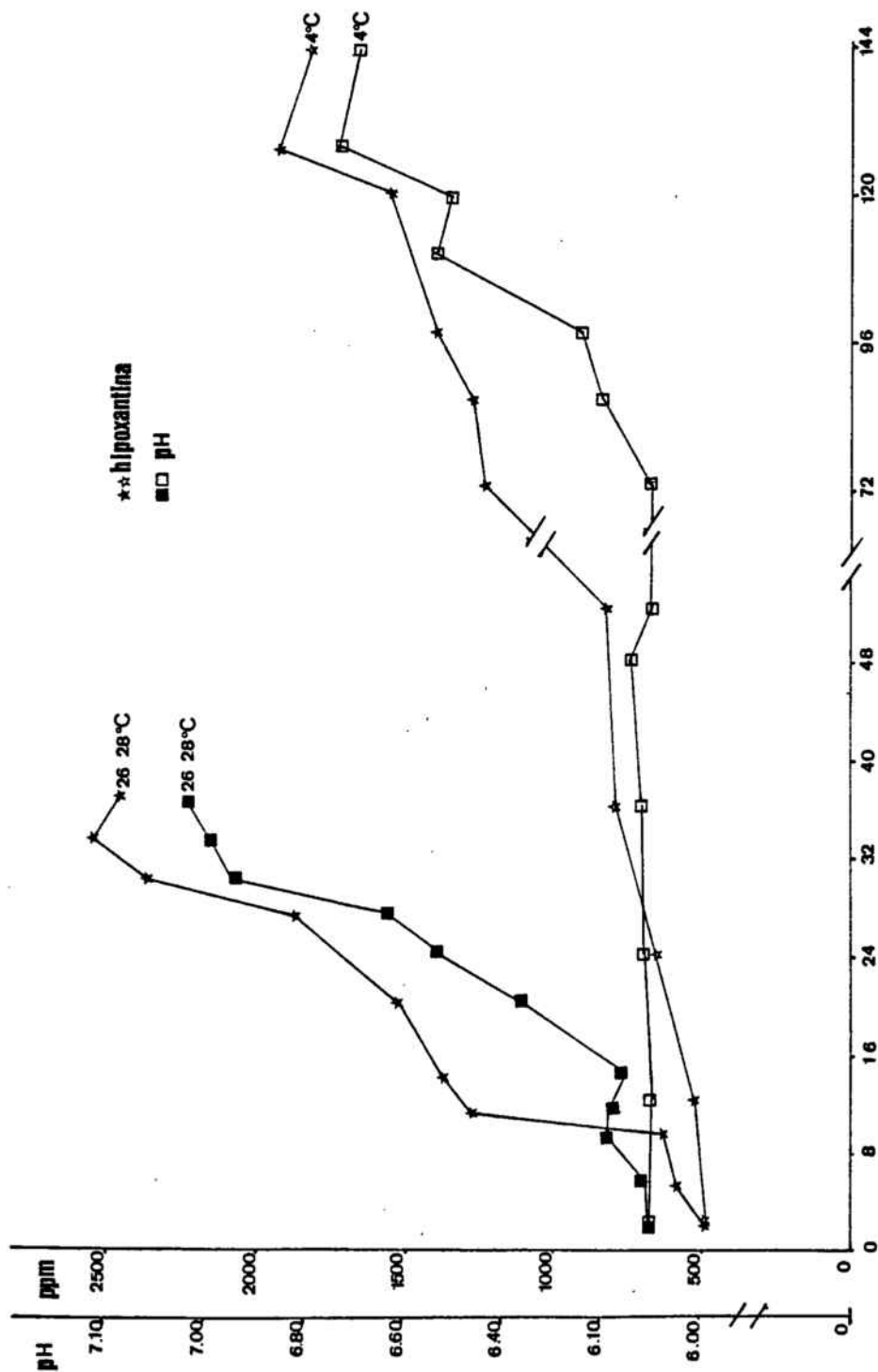


Figura 23. Evolución de los contenidos de trimetilamina y de bases volátiles durante la descomposición del boquerón a temperatura ambiente y a 4 °C (segundo ensayo)

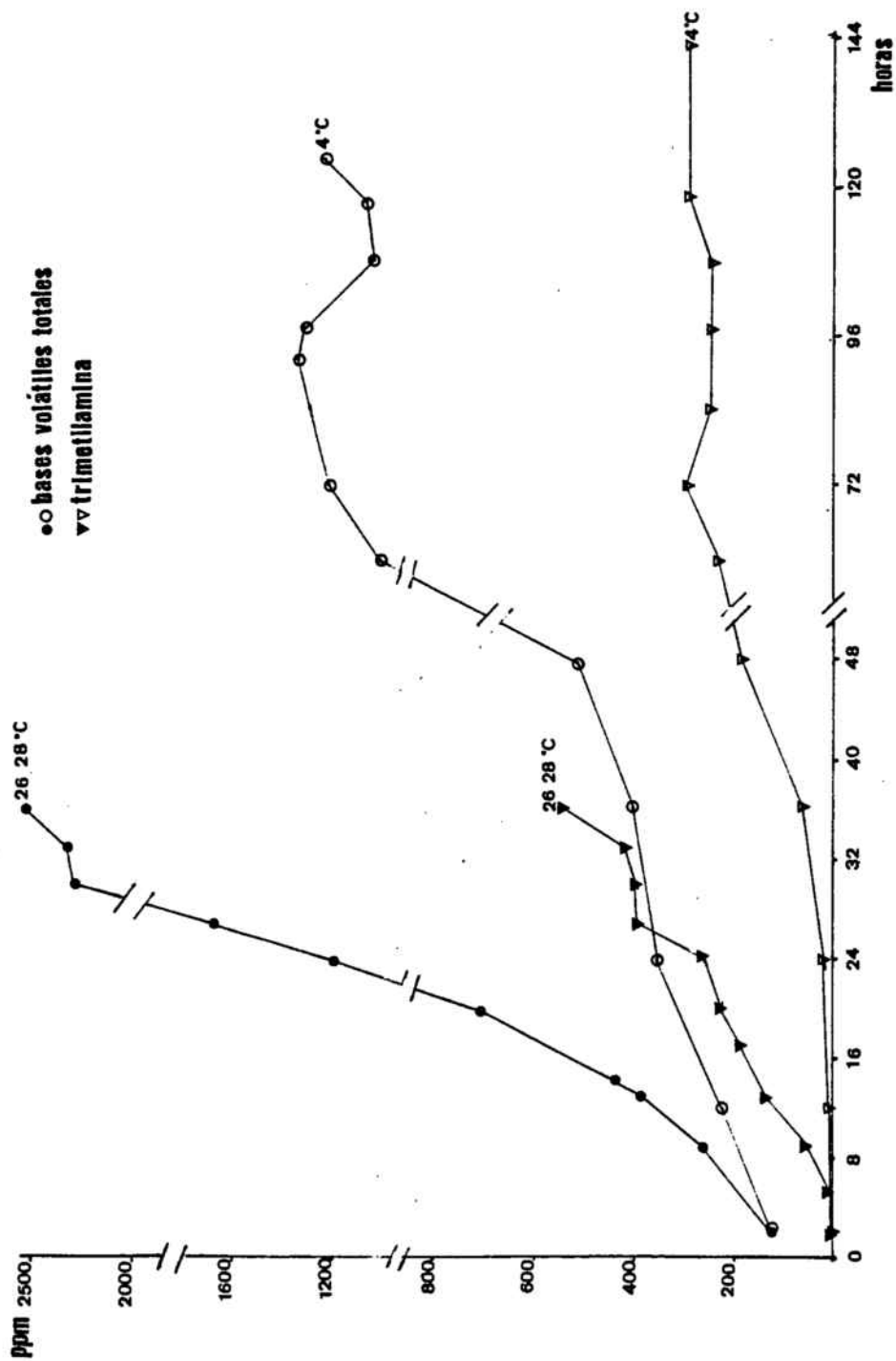


Tabla 17- Estudio de la correlación de Histamina y Tiramina con los demás parámetros estudiados. (1er ensayo).

	AMBIENTE			NEVERA		
	G.L.	r	P %	G.L.	r	P %
TIRAMINA HISTAMINA	11	0.9727	99.9	5	0.9969	99.9
HISTAMINA HIPOXANTINA	11	0.8910	99.9	correlación no signif.		
HISTAMINA TMA	9	0.8488	99.9	5	0.9991	99.0
HISTAMINA pH	11	0.9818	99.9	correlación no signif.		
TIRAMINA HIPOXANTINA	11	0.8766	99.9	5	0.9483	99.9
TIRAMINA pH	11	0.6331	97.5	correlación no signif.		
TIRAMINA TMA	9	0.8840	99.9	5	0.9364	99.9

Tabla 18 Estudio de la correlación de Histamina y Tiramina con los demás parámetros estudiados. (2º ensayo).

	AMBIENTE			NEVERA		
	G.L.	r	P %	G.L.	r	P %
TIRAMINA HISTAMINA	9	0.9338	99.9	9	0.7831	99.5
HISTAMINA HIPOXANTINA	8	0.8851	99.9	11	0.9552	99.9
HISTAMINA TMA	9	0.9476	99.9	10	0.7763	99.5
HISTAMINA pH	9	0.9381	99.9	11	0.8555	99.9
HISTAMINA BVT	8	0.9663	99.9	11	0.8814	99.9
TIRAMINA HIPOXANTINA	8	0.9738	99.9	11	0.8814	99.9
TIRAMINA pH	9	0.9191	99.9	12	0.7710	99.5
TIRAMINA TMA	9	0.9879	99.9	10	0.9589	99.9
TIRAMINA BVT	9	0.9384	99.9	11	0.9427	99.9

8.- CONTENIDOS DE HISTAMINA Y TIRAMINA EN CONSERVAS Y SEMICONSERVAS DE PESCADO

8.1- MUESTRAS ESTUDIADAS

Puesto que en pescados frescos el contenido de aminas biógenas es muy bajo y aumenta a medida que se avanza en el proceso de descomposición de estos productos, cabe suponer que niveles altos de estas aminas en conservas serían indicativos de una mala calidad de materia prima, en el sentido de que la misma no fuera lo suficientemente fresca. En la elaboración de conservas de pescado intervienen tratamientos térmicos que destruyen la flora microbiana, por ello la formación de estas aminas (ligada a la acción bacteriana) es previa a estos tratamientos, que por otra parte resisten debido a su carácter de aminas no volátiles.

En el caso de las semiconservas de pescado estabilizadas pero no esterilizadas, las aminas biógenas pueden ser indicativas de mala calidad de la materia prima pero también pueden ser consecuencia de la actividad microbiana que participa en la maduración de estos productos o también de posibles contaminaciones bacterianas durante este proceso (esta cuestión está todavía sin resolver).

La segunda parte de nuestro trabajo consistió en efectuar un sondeo de mercado para estudiar los contenidos de histamina y de tiramina en distintos tipos de conservas y semiconservas. Concretamente se analizaron 15 muestras de conservas de atún, 12 muestras de conservas de sardina, 5 muestras de caballa y 5 de arenque y además 15 de semiconservas de anchoa. Dentro de cada grupo se estudiaron productos de distintas marcas comerciales.

8.2.- RESULTADOS

En las tablas 19 y 19-bis se muestran los resultados obtenidos en cuanto a los contenidos de histamina y de tiramina en las muestras estudiadas. Se incluye además, para cada tipo de muestra, su forma de elaboración en productos de un mismo tipo.

Se efectuaron análisis de la varianza, para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones medias de histamina y de tiramina en los distintos tipos de muestras estudiadas.

Así, en primer lugar se compararon los contenidos de ambas aminas entre conservas y semiconservas.

Tabla 19 Contenido de histamina y tiramina en conservas y semiconservas de pescado.

TIPO de PESCADO	MODO de ELABORACION	CONTENIDO HISTAMINA	CONTENIDO TIRAMINA		
Atún	migas en aceite	12.50	7.75		
		12.15	3.60		
	en aceite	30.95	0.60		
		13.30	0.80		
		4.35	0.65		
		6.95	0.50		
		9.75	0.60		
		5.35	0.45		
	en escabeche	1.50	5.15		
		2.10	1.35		
	frito en aceite	19.20	0.50		
	paté escabeche	15.45	2.75		
	Sardinas	en aceite	14.75	1.10	
			16.30	1.65	
9.70			2.00		
14.30			8.90		
15.45			1.55		
4.40			1.55		
7.90			2.00		
en escabeche		7.30	1.30		
		10.50	0.70		
		20.80	1.40		
		11.35	1.40		
		12.90	1.30		
		Anchoas	en aceite	22.30	66.40
				37.20	15.10
31.80	35.90				
21.45	19.90				
60.80	62.24				
59.50	48.14				
67.95	45.10				
50.80	35.90				

Tabla 19-bis Contenido de histamina y tiramina en conservas y semiconservas de pescado.

TIPO de PESCADO	MODO de ELABORACION	CONTENIDO HISTAMINA	CONTENIDO TIRAMINA
Anchoas	en aceite	7.70	22.20
		12.70	14.91
		25.30	20.65
	paté	42.40	14.90
Anchoas de l'Escala	en aceite	219.20	14.35
		13.95	14.3
	al natural	2.45	1.3
Caballa	en aceite	9.35	2.60
		28.30	1.05
		9.65	1.25
		16.10	0.60
	al natural	6.60	1.25
Arenques	en aceite	9.30	0.15
	en salsa	2.65	0.90
		1.35	1.60
		1.35	9.50
	ahumados	2.00	8.45

Tabla .20 Análisis de la varianza entre los contenidos de histamina y de tiramina en conservas y en semiconservas

HISTAMINA

CONSERVAS	SEMICONSERVAS
$\bar{X} = 10.85$	$\bar{Y} = 36.66$
$n = 34$	$n = 12$

HIPOTESIS: $H_0 = \bar{X} = \bar{Y}$

$P = 0.05$; $GL = 1;44$ $F_t = 4.06$
 $F_{\alpha} = 46.16$

CONCLUSION : $\bar{X} \neq \bar{Y}$

TIRAMINA

CONSERVAS	SEMICONSERVAS
$\bar{X} = 2.30$	$\bar{Y} = 33.27$
$n = 34$	$n = 12$

HIPOTESIS: $H_0 = \bar{X} = \bar{Y}$

$P = 0.05$; $GL = 1.44$ $F_t = 4.06$
 $F_{\alpha} = 91.86$

CONCLUSION : $\bar{X} \neq \bar{Y}$

A la vista de estos resultados podemos concluir que los contenidos medios de histamina y de tiramina en conservas y semiconservas muestran diferencias estadísticamente significativas, siendo más elevados en semiconservas.

Puesto que en el grupo de las conservas se incluían diferentes tipos de productos, se realizó igualmente un

análisis de la varianza para comprobar si existían o no diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de pescado de los que se disponía de un mayor número de muestras (tabla 21)

Tabla 21. Análisis de la varianza para comprobar los contenidos de histamina y de tiramina entre conservas de atún y de sardinas

HISTAMINA

<p>ATUN</p> <p>$\bar{X} = 10.30$</p> <p>$n = 12$</p>	<p>SARDINAS</p> <p>$\bar{Y} = 12.24$</p> <p>$n = 12$</p>
--	--

HIPOTESIS: $H_0 = \bar{X} = \bar{Y}$

$P = 0.05$; $GL = 1.22$ $F_{\alpha} = 4.30$
 $F_{\alpha-x} = 0.73$

CONCLUSION : $\bar{X} = \bar{Y}$

TIRAMINA

<p>ATUN</p> <p>$\bar{X} = 2.06$</p> <p>$n = 12$</p>	<p>SARDINAS</p> <p>$\bar{Y} = 2.17$</p> <p>$n = 12$</p>
---	---

HIPOTESIS: $H_0 = \bar{X} = \bar{Y}$

$P = 0.05$; $GL = 1.22$ $F_{\alpha} = 4.30$
 $F_{\alpha-x} = 0.01$

CONCLUSION : $\bar{X} = \bar{Y}$

De este último análisis se deduce que los contenidos medios de histamina, al igual que los de tiramina, entre conservas de atún y de sardina no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Se efectuaron además análisis de la varianza para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos medios de histamina y los de tiramina en los en cada uno de los distintos tipos de productos estudiados.

En la tabla 22. aparecen los datos correspondientes a este análisis para las semiconservas y en la tabla 23 los que corresponden a las conservas (atún y sardinas).

Tabla 22 Comparación entre los contenidos de histamina y de tiramina en semiconservas de anchoas, mediante el análisis de la varianza.

HISTAMINA

$\bar{X} = 36.66$
 $n = 12$

TIRAMINA

$\bar{Y} = 33.30$
 $n = 12$

HIPOTESIS: $H_0 = \bar{X} = \bar{Y}$

$P = 0.05$; $GL = 1.22$

$F_{\alpha} = 4.30$

$F_{\alpha, x} = 0.196$

CONCLUSION : $\bar{X} \neq \bar{Y}$

Tabla 23. Relación mediante análisis de la varianza, entre los contenidos medios de histamina y tiramina en conservas de atún y de sardinas

ATUN	
HISTAMINA	TIRAMINA
$\bar{X} = 11.12$	$\bar{Y} = 2.06$
$n = 12$	$n = 12$
HIPOTESIS: $H_0: \bar{X} = \bar{Y}$	
$P = 0.05$; $GL = 1.22$	$F_{\alpha} = 4.30$ $F_{\alpha, x} = 22.00$
CONCLUSION : $\bar{X} = \bar{Y}$	
SARDINAS	
HISTAMINA	TIRAMINA
$\bar{X} = 12.14$	$\bar{Y} = 2.17$
$n = 12$	$n = 12$
HIPOTESIS: $H_0: \bar{X} = \bar{Y}$	
$P = 0.05$; $GL = 1.22$	$F_{\alpha} = 4.30$ $F_{\alpha, x} = 48.21$
CONCLUSION : $\bar{X} = \bar{Y}$	

De los resultados de este análisis se deduce que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos medios de histamina y de tiramina en semiconservas de anchoa, mientras que si existen en el caso de las conservas de atún y de sardinas.

8.3- DISCUSION

En primer lugar cabe señalar que los resultados obtenidos en las diferentes muestras estudiadas, revelan una amplia dispersión de resultados en cuanto a los contenidos, tanto de histamina como de tiramina y no sólo en función del tipo de producto sino también entre diferentes muestras de un mismo tipo. Esta dispersión queda reflejada en la figura 24, en la que se han representado los contenidos medios y las desviaciones estándar correspondientes a la histamina y la tiramina de cada uno de los tipos de muestra analizados.

Destaca de esta figura, que los contenidos medios tanto de histamina como de tiramina en semiconservas de anchoa son más elevados que los de las otras muestras estudiadas (conservas).

A pesar de que la dispersión es importante, mediante un análisis de la varianza y asumiendo un nivel de riesgo de $\alpha = 0.05$, se comprobó que en efecto los contenidos medios de ambas aminas biógenas eran estadísticamente más elevadas en semiconservas de anchoa que en los productos de conserva considerados.

Conservas de atún, sardinas, caballa y arenques.

Para apreciar mejor los diferentes contenidos de aminas biógenas presentes en estos tipos de muestras, se han representado gráficamente en forma de histogramas: fig.25 para las conservas de atún, fig.26 para las conservas de sardina y fig.27 para las de caballa y arenques.

En los tres grupos de conserva se observan contenidos variables; los intervalos de concentración hallados son los siguientes (valores en ppm):

	Atún	Sardina	Caballa-Arenque
Histamina	1.5-30.95	4.4-16.3	1.35-28.30
Tiramina	0.5-7.75	0.7-8.9	0.60-9.50

La posibilidad de que pudiesen existir diferencias atribuibles al modo de elaboración (en aceite, tomate...) no ha sido considerada, debido a que en principio estos procesos no están relacionados con una mayor o menor actividad microbiana. De hecho, ya se ha comentado que en las conservas de pescado los contenidos de aminas biógenas

presentes en el producto acabado, reflejan exclusivamente el contenido de estas sustancias en las materias primas; siempre y cuando no se trate de productos sometidos a procesos de fermentación/maduración o bien, que no se hallan producido contaminaciones microbianas posteriores a su procesamiento. Así pues, no es principio lógico que existan diferencias atribuibles al modo de elaboración antes eludido. Ello ha sido no obstante comprobado por el grupo de TOXICOLOGIA DE MAJADAHONDA (1982); MIETZ y KARMAS (1977) y TUAN TSAI (1981). Sin embargo, una cuestión diferente y que probablemente requeriría un estudio más detallado, sería la posibilidad de que existieran diferencias en la calidad de las materia primas destinadas a la elaboración de los distintos tipos de conservas.

En relación con los trabajos realizados previamente por otros autores, respecto a productos igualmente españoles, cabe señalar que los contenidos máximos hallados en nuestro estudio son algo más elevados. Así el GRUPO TOXICOLOGICO DE MAJADAHONDA (1982), en un estudio realizado para estos mismos tipos de conservas observaron que los niveles eran más altos en atún que en sardinas.

Los contenidos de histamina determinados en nuestro estudio son más altos que los señalados por otros autores en productos enlatados españoles. Así, el GRUPO TOXICOLOGICO DE MAJADAHONDA (1982) encuentra contenidos relativamente bajos en conservas de atún y de sardinas. FERNANDEZ y MACKIE (1987) en un estudio de los contenidos de aminas en conservas de sardinas elaboradas y comercializadas en España determinaron contenidos también bajos de esta amina, de 0 a 5 ppm.

En relación con productos extranjeros, en cuanto a la tiramina, sucede lo contrario; para las conservas de atún se señalan contenidos de tiramina que van desde 0 hasta 900 ppm (WORTBERG y col, 1981; HUI y TAYLOR, 1983; SCHUTZ y ZIMMERMAN, 1980), mientras que en las 12 muestras de atún que se analizaron en nuestro trabajo en ningún caso se superaron las 10 ppm de tiramina.

También cabe citar, que en relación con trabajos anteriores, se observa una diferencia entre nuestro resultados y los hallados por el GRUPO TOXICOLOGICO DE MAJADAHONDA (1972). Este grupo concluyó que existían niveles más elevados de histamina en conservas de atún que en conservas de sardinas, mientras que en nuestro caso dicha diferencia no se ha establecido.

En los los histogramas correspondientes a los contenidos de histamina y tiramina de las conservas estudiadas (fig.25, 26 y 27) se observa claramente que, en función de los intervalos de concentración señalados, aparecen para cada muestra, en la gran mayoría de los casos, niveles de histamina superiores a los de tiramina, llegando a alcanzarse diferencias significativas en algunas de las concentraciones halladas. Así en las conservas de atún, sólo en una muestra, la nº 6, no se observó tendencia (único caso en que los niveles de tiramina fueron superiores a los de histamina). En cuanto a las conservas de sardina, no se observó ninguna excepción a esta tendencia.

Mediante el análisis de la varianza se demuestra que el contenido medio de histamina es más elevado que el de tiramina en estos productos.

De las conservas de caballa y arenques consideramos que no se pueden hacer comentarios al respecto puesto que el número de muestras estudiadas era más bajo.

Semiconservas de anchoa.

Mención especial merecen el caso de las semiconservas de anchoa ya que en este tipo de productos, tanto los contenidos de histamina como los de tiramina, resultaron significativamente más altos que en el caso de productos en conserva, tal como ya se había señalado.

Los intervalos de concentración hallados en este caso fueron:

- Histamina: 2.45 - 67.95
- Tiramina: 1.30 - 66.40

En estos intervalos no se han contemplado los contenidos de una muestra de Anchoas de L'Escala que presentaba un nivel de histamina muy elevado (219 ppm) si bien su contenido en tiramina, (14,35 ppm) estaría incluido dentro de los límites de concentración encontrados para las muestras de este tipo.

A diferencia de las conservas, en las semiconservas de anchoa no se observa una clara diferencia entre los contenidos de ambas aminas, ni considerando los contenidos mínimos y máximos hallados en el conjunto de productos de este tipo, ni considerando las muestras individualmente

(únicamente en dos casos, muestras nº 1 y 11 se presentaron contenidos más elevados de tiramina que de histamina). Igualmente mediante el análisis de la varianza se confirmó que en estos productos, a diferencia de en las conservas, no existen diferencias estadísticamente significativas de ambas aminas.

Una posible explicación de los contenidos más altos de histamina y tiramina (respecto a las conservas) podría derivarse de las características propias de su proceso de elaboración

Las semiconservas de anchoa se elaboran a partir de pescados de la especie Engraulis encrasicolus que son sometidos a un proceso de salado prensado y maduración y que cuando se han alcanzado las características organolépticas adecuadas, se estabiliza mediante la adición de vinagre, aceite o salmuera. Por tanto, existe una diferencia fundamental entre las conservas y las semiconservas de anchoa, ya que estas últimas están sometidas a un proceso de maduración-fermentación en el que pueden participar microorganismos con actividad tirosin-descarboxilásica (SANTOS-BUELGA, 1984).

Su posterior procesamiento como semiconservas, que no incluye tratamiento térmico a diferencia de la elaboración de conservas, implica que la maduración no cesa y tanto el crecimiento de microorganismos como la posterior formación de aminas pueden prolongarse durante el almacenamiento. De hecho estos productos tienen una duración limitada de seis meses y deben mantenerse en refrigeración (precaución que no siempre se observa).

Así, en definitiva, las aminas biógenas encontradas en este tipo de productos pueden responder a varios orígenes:

- consecuencia de la actividad aminoácido descaboxilásica de los microorganismos responsables de la maduración

- fruto de la actividad de microorganismos responsables de contaminaciones no deseadas en la materia prima o durante los procesos de elaboración

- fruto de la actividad bacteriana, en el producto una vez elaborado, si el mismo se mantiene en condiciones inadecuadas fundamentalmente de temperatura de modo que se encuentre favorecido el desarrollo de microorganismos.

Dado que COGUL (1987) comprobó que a en boquerónes en vinagre elaborados también a partir de la especie Engraulis encrasicolus y procesados como semiconservas pero sin haber sido sometido al proceso de maduración tan prolongados, los contenidos en tiramina eran notablemente inferiores (menores de 2.3 ppm), cabe pensar que en efecto el proceso de maduración conlleva a una formación de estas sustancias. Obviamente a esta formación, no necesariamente la única responsable del contenido final de aminas se añadirían las que de por sí tuvieran las materias primas.

Desde una perspectiva toxicológica podemos concluir, que si se aceptan como límites de riesgo para la producción de migraña las dosis de 10-18 mg de tiramina propuestas por EDWARDS y SANDINE (1981), ninguna de las muestras de conservas y semiconservas de pescado que se analizaron representaría un peligro toxicológico, siempre y cuando se considerase un consumo razonable de las mismas.

No deben olvidarse sin embargo, el aporte de histamina y tiramina por otros alimentos que eventualmente podrían también contenerlas.

Mención especial merece el caso de los pacientes tratados con medicamentos de tipo IMAO, ya que en estas circunstancias el límite de tolerancia para la tiramina es más bajo (6 mg) (EDWARDS y SANDINE, 1987).

Como en el caso de la tiramina debe de considerarse además del peligro toxicológico de las intoxicaciones histamínicas, que se presentan con mayor frecuencia en individuos histamino sensibles, las interacciones con otros alimentos que contengan sustancias de acción sinérgica y la interacción con medicamentos de tipo IMAO.

Durante estos tratamientos es habitual recomendar una reducción del consumo de alimentos susceptibles de presentar contenidos altos de estas aminas. Nuestros resultados, sobre todo en el caso de las semiconservas de anchoa, vienen a corroborar la conveniencia de esta recomendación, siempre y cuando el verdadero límite de tolerancia se encuentre en 6 mg de tiramina.

En cuanto a la posibilidad de que se produzcan "intoxicaciones histamínicas", la valoración de este riesgo en los productos estudiados se hace más difícil debido a las discrepancias existentes entre los diferentes autores a la hora de marcar un límite máximo admisible. Así se han señalado cifras que oscilan entre 50 y 600 ppm. (Ienistea, 1973 en CHAMBERS y SRTARUSZKIZWICZ, 1978; BARANOWSKY y BRUST, 1984; TAYLOR y col., 1984; Karolus y col. 1985).

Si consideramos el criterio más exigente (50 ppm) sólo el consumo de algunas semiconservas sería susceptible de provocar síntomas de intoxicación y por el contrario ninguna de las muestras estudiadas las provocaría si el verdadero límite de tolerancia fueran 600 ppm.

Fig. 24 Contenidos medios y desviación standar de histamina y de tiramina en las diversas muestras estudiadas.

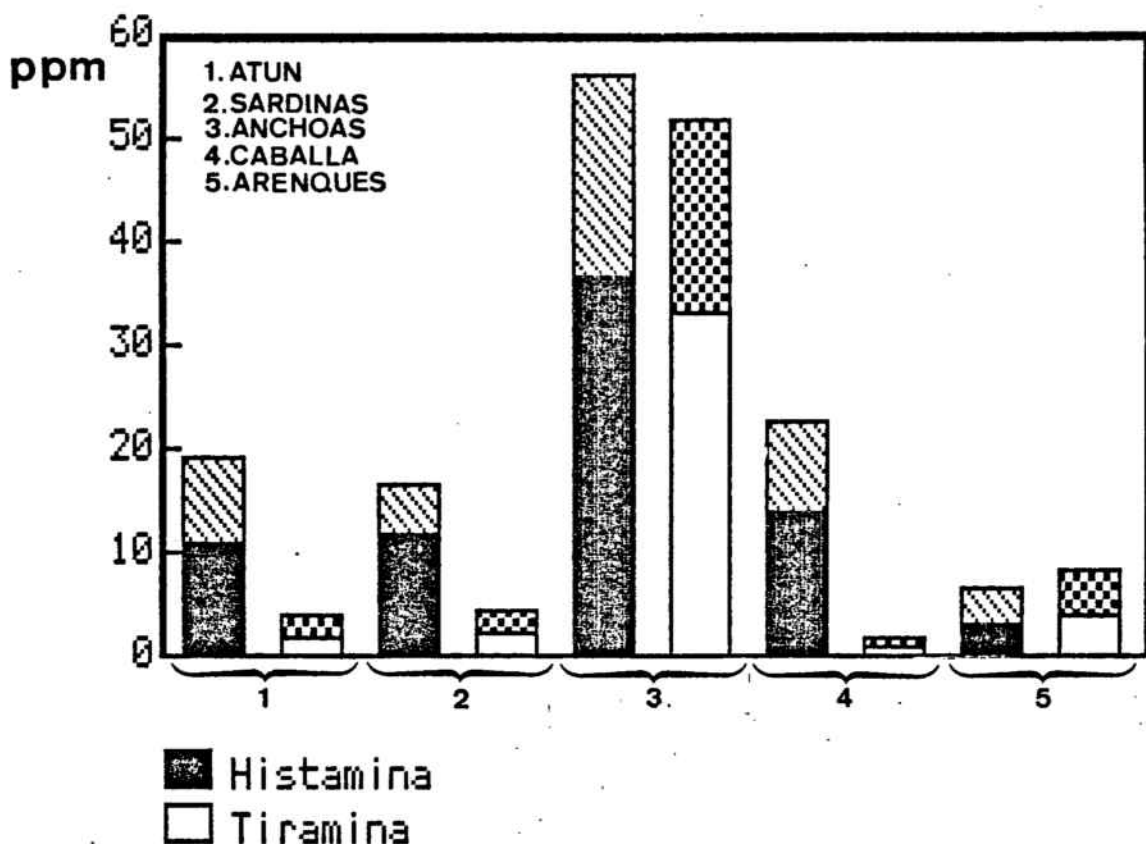


Fig 25 Contenidos de histamina y de tiramina en conservas de atún

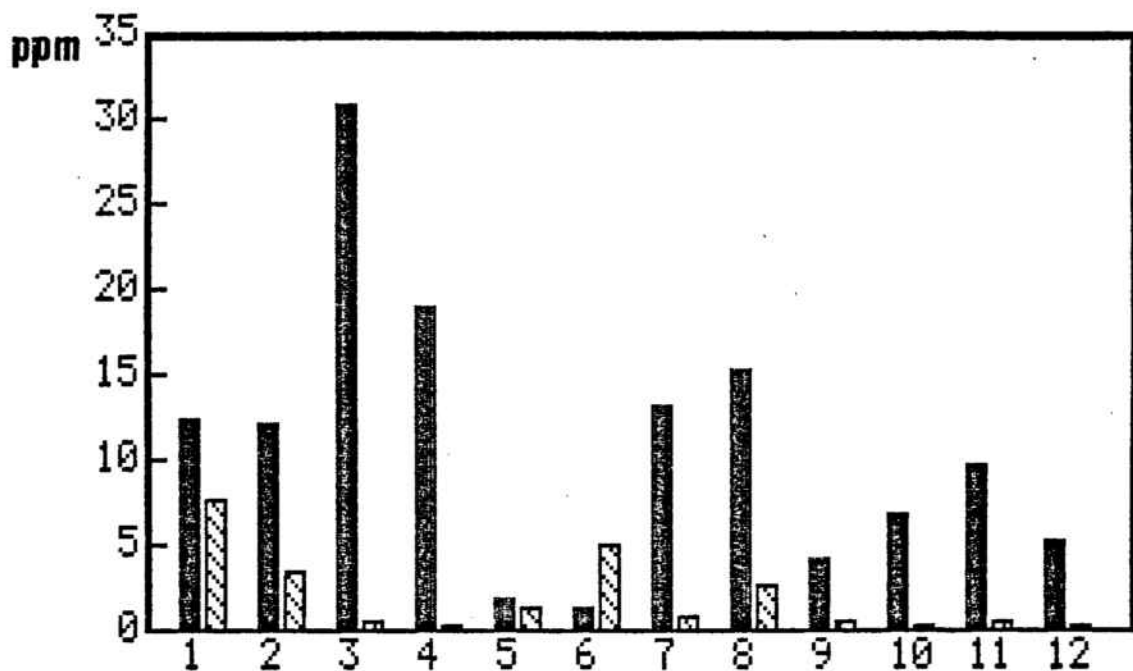


Figura 26. Contenidos de histamina de tiramina en conservas de sardina.

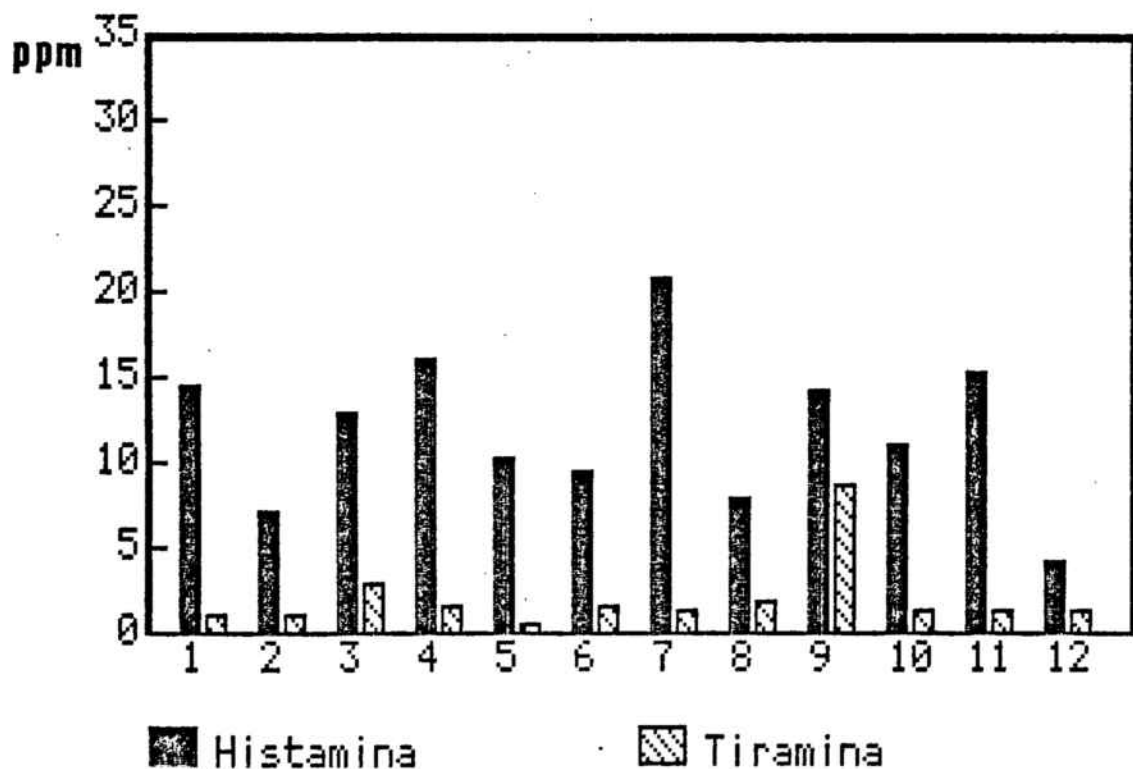


Figura 27. Contenidos de histamina y de tiramina en conservas de caballa y arenque.

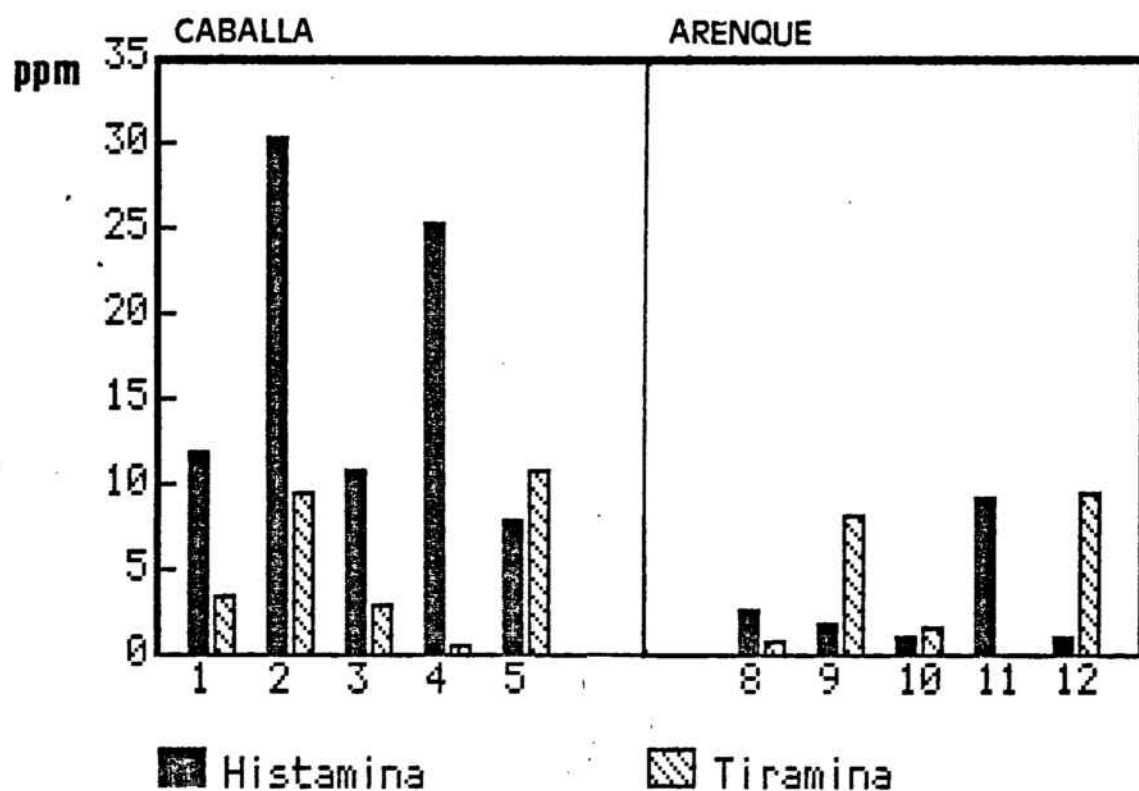
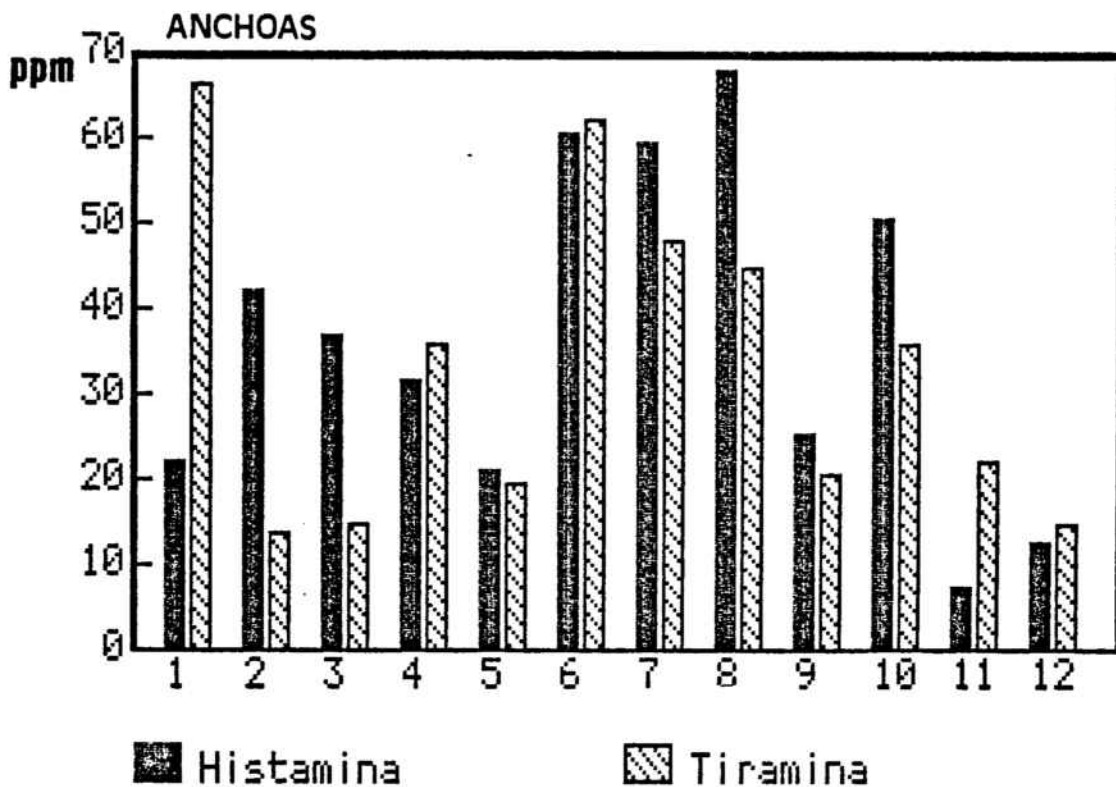


Figura 28 Contenidos de histamina y de tiramina en semiconservas de anchoa.



9.- CONTENIDOS DE HISTAMINA Y TIRAMINA EN SEMICONSERVAS DE ANCHOAS A LO LARGO DE SU PERIODO DE CONSERVACION.

9.1.- PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y MUESTRAS ESTUDIADAS.

Tras el estudio de los contenidos de histamina y de tiramina en conservas y semiconservas, y dado que en estas los contenidos en aminos eran siempre superiores, se planteó un estudio para determinar si en este tipo de productos (semiconservas de anchoa en aceite concretamente) se observaba un aumento en los contenidos de aminos biógenos durante el periodo de almacenamiento del producto acabado.

Se tomó un grupo de 9 latas de semiconserva de anchoa, de la misma marca comercial y pertenecientes a un mismo lote de fabricación. De una primera lata, se analizó su contenido en histamina y en tiramina inmediatamente después de su adquisición, tras haber retirado de la lata el aceite de cobertura, y de homogenizar convenientemente.

El resto de las latas se guardaron sin abrir hasta el momento de su análisis, que en todos los casos fue precedido por las operaciones antes descritas.

Cuatro de estas latas se mantuvieron en refrigeración a 4 grados centígrados, y las otras 4 se guardaron a temperatura ambiente.

Recordemos que las semiconservas de pescado son productos estabilizados, pero no esterilizados y por tanto, la actividad bacteriana puede permanecer en el "producto acabado". Por ello las semiconservas tienen una durabilidad más corta que las conservas y además debe guardarse en refrigeración.

El estudio en paralelo de estos dos subgrupos (a 4 grados y a temperatura ambiente) tiene como objetivo conocer el efecto de la temperatura en el periodo de almacenamiento post-elaboración.

El periodo de estudio se prolongó hasta 8 meses a partir de la fecha de elaboración, con lo cual se abarca toda la vida comercial de estos productos (durabilidad 6 meses).

9.2.- RESULTADOS

En la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos en las determinaciones del contenido de histamina y de tiramina en los dos subgrupos de estudio, a lo largo del tiempo que duró el ensayo.

Tabla 20 Contenidos de histamina y tiramina en semiconservas de anchoa a lo largo de su almacenamiento a temperatura ambiente y en refrigeración.

TIEMPO meses	HISTAMINA ppm		TIRAMINA ppm	
	4° C.	T ^a Ambiente	4° C.	T ^a ambiente
2		25.28		20.65
3	15.50	12.70	14.10	24.30
4	13.10	9.40	17.10	23.30
6	15.45	116.95	17.85	21.65
8	11.10	210.00	23.25	24.80

El lote de anchoas sometido a estudio había sido fabricado dos meses antes de su adquisición y por ello el primer tiempo considerado ha sido de dos meses.

9.3.- DISCUSION

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que no se observa aumento significativo en el contenido de estas dos aminas durante los primeros cuatro meses de almacenamiento, sinque la temperatura ejerza al respecto efectos apreciables en este periodo de tiempo (Fig. 29).

Sin embargo, a partir de los 6 meses se observó un aumento en el contenido de histamina en las semiconservas de anchoas, que habian sido mantenidas a temperatura ambiente, mientras que en las semiconservas almacenadas en refrigeración los contenidos de histamina se mantuvieron igualmente bajos.

En cuanto a los contenidos de tiramina observamos que se mantienen relativamente constantes durante los 8 meses que se prolongó el estudio.

En cualquier caso cabe destacar que si bien en nuestro estudio se observaron aumentos claros en el contenido de histamina, ello sólo sucede si el almacenamiento se realiza a temperatura ambiente y tras un periodo de tiempo largo, superior al de la vida comercial de este tipo de productos (6 meses).

Debemos señalar igualmente que las oscilaciones obtenidas en los resultados de los contenidos de aminas pueden justificarse en base a variaciones derivadas de la aplicación en cada caso del protocolo analítico, y también sobretodo, a posibles diferencias interindividuales entre las muestras de un mismo lote. Este último factor de variabilidad, es no obstante inevitable si no se recurre a una homogeneización previa de toda la muestra a estudiar; lo que en nuestro caso hubiera significado abrir todas las latas, triturar y homogeneizar sus contenidos y redistribuir alícuotas para los sucesivos análisis. En este primer ensayo no se siguió esta pauta porque no se deseaba modificar las condiciones originales del producto. Sin embargo, para eliminar este factor de variación, en estudios posteriores deberá plantearse esta homogeneización previa de la muestra, evidentemente en condiciones asépticas para evitar contaminaciones microbianas, que igualmente podrían alterar los resultados.

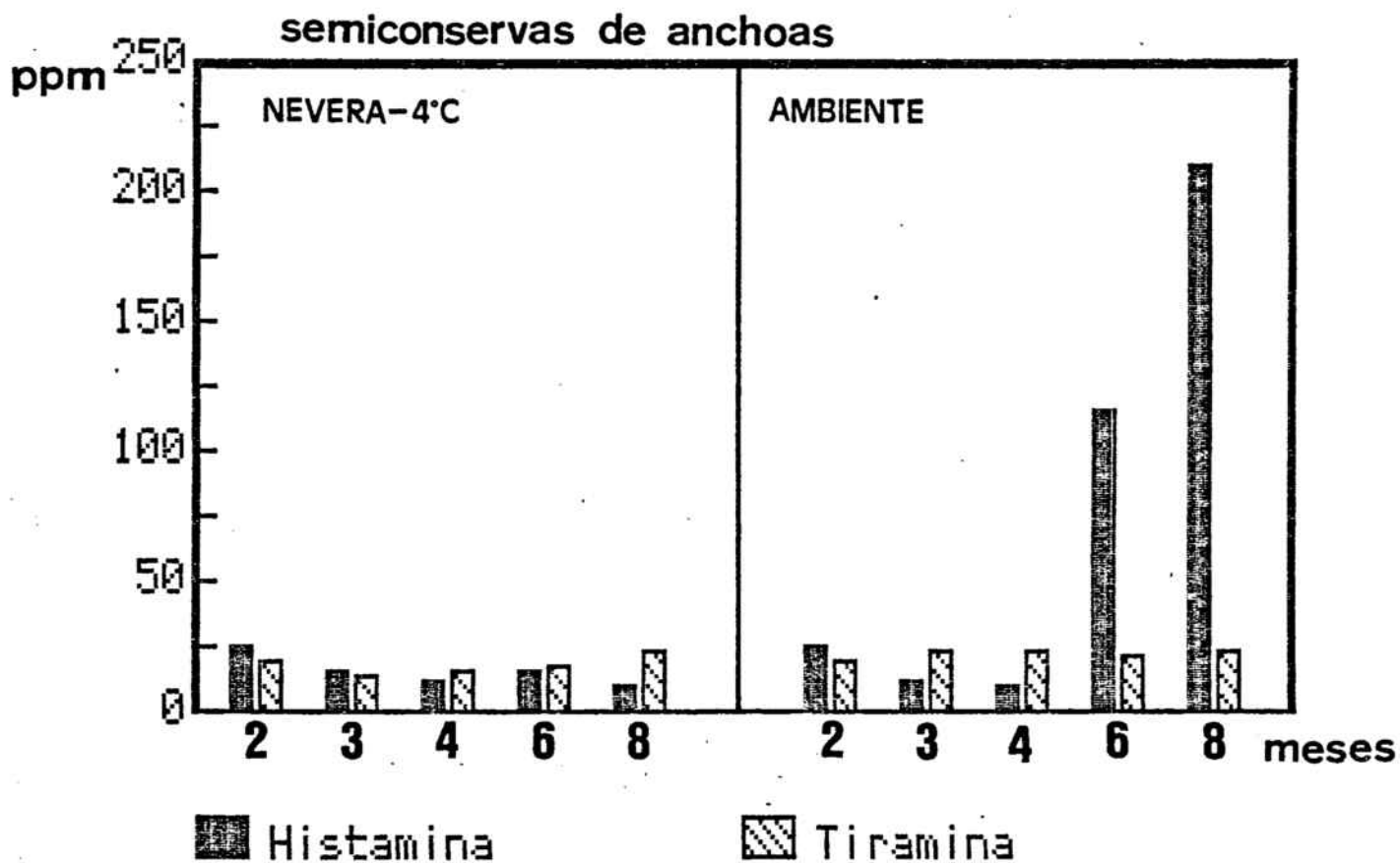
Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en una experiencia previa semejante (SANTOS-BUELGA, 1984), que observó incrementos importantes del contenido de tiramina de semiconservas de anchoa durante el periodo de almacenamiento en un tiempo mucho más corto que el de nuestro estudio. Partiendo de inicios de tiramina, a las 15 semanas en

muestras de un mismo lote de fabricación, el citado autor encuentra 67.08 ppm. Sin embargo, tras alcanzarse este pico, los contenidos descendían encontrándose a las 25 semanas sólo 28.6 ppm. A la vista de estos resultados, en cierto modo algo contradictorios, la primera conclusión que se debe extraer es la de la necesidad de plantear nuevos estudios similares, a fin de observar si se mantiene o no esta disparidad.

En cualquier caso, este estudio previo nos permite plantear la hipótesis de que los contenidos más altos de estas aminas, hallados en semiconservas de anchoa (ver apartado 8.2), puede contribuir también una posible formación de estas sustancias en el "producto acabado" si el mismo se mantiene a temperaturas inadecuadas.

Si bien se trata de una cuestión que obviamente debería comprobarse, ante estos resultados se podría plantear la pregunta de si los presuntamente elevados contenidos de histamina, que parecen presentar con relativa frecuencia semiconservas de anchoa española, y que por ello son objeto de rechazo por parte de países importadores europeos son atribuibles al producto en sí o se deben a deficientes condiciones de transporte o de almacenamiento, ya sean en el país de origen o incluso en el propio de destino.

Fig. 29 Evolución de los contenidos de histamina y de tiramina durante el almacenamiento a temperatura ambiente y a 4°



10.- CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

Los resultados expuestos en esta memoria permiten obtener las siguientes conclusiones:

1.- La adaptación a pescados de la técnica espectrofluorimétrica puesta a punto en nuestro laboratorio para la determinación de histamina en vinos, proporciona resultados satisfactorios en términos de precisión (CV=6.70%) y de recuperación (95.94%).

2.- Si bien serán necesarios estudios posteriores para contrastar nuestros resultados, en base a los mismos cabe considerar que tanto la histamina como la tiramina pueden tener interés como indicadores del estado higiénico sanitario de los boquerones debido a que:

- (a) Su contenido aumenta considerablemente a lo largo de la descomposición de estos pescados a temperatura ambiente y también en refrigeración, partiendo de niveles despreciables en producto fresco.

- (b) El aumento del contenido de estas sustancias tiene lugar al mismo tiempo que la trimetilamina y las bases volátiles totales, que son indicadores clásicos de frescura, relacionados, al igual que las aminas biógenas, con actividad la bacteriana.

- (c) En relación con la hipoxantina, se comprueba igualmente que la aparición de los niveles altos de aminas biógenas coincide con el aumento brusco de este parámetro, si bien por ser la hipoxantina un compuesto relacionado con la actividad enzimática que se inicia tras la muerte del pez, independientemente de que exista o no proliferación bacteriana (aunque esta también le afecta); sus niveles de concentración aumentaron ya a partir de la primera muestra analizada.

Existen, sin embargo, limitaciones para la utilización de las aminas biógenas como indicadores del estado higiénico-sanitario del pescado, debidas fundamentalmente a la existencia de variabilidad entre especies y a la posiblemente distinta capacidad aminoácido-descarboxilásica de los microorganismos que pueden proliferar en el pescado. Esta variabilidad también existe, no obstante, en lo que respecta a las otras sustancias estudiadas y de hecho, en la actualidad, no existe ningún parámetro químico completamente adecuado y aceptado por todos para tal fin. Por esta razón, se justifica el proseguir con el estudio de las aminas

biógenas en pescados, a fin de establecer, si fuera posible, unos límites por encima de los cuales se pudiera considerar que el pescado no reúne los deseables requisitos de calidad.

3. Del estudio de mercado realizado en cuanto a contenidos de histamina y de tiramina en conservas y semiconservas de pescado cabe destacar que:

3.1. Los contenidos de ambas aminas han sido notablemente más altos en semiconservas de anchoas que en conservas de atún, sardinas, caballa y arenques.

Dado que la elaboración de conservas de pescado comprende un tratamiento térmico, que destruye la flora microbiana, la presencia de niveles elevados de aminas biógenas en estos productos sería debida a su presencia en la materia prima. Las aminas biógenas son compuestos termosestables, a diferencia de la trimetilamina y de las bases volátiles totales, y precisamente en este hecho radica su verdadero interés desde un punto de vista tecnológico.

3.2. En las conservas estudiadas destaca que, mayoritariamente, el contenido de histamina es más elevado que el de tiramina. Esta diferencia no se observa en las semiconservas.

3.3. Los contenidos de tiramina encontrados en 2 de las 15 muestras de semiconservas de anchoa analizadas son susceptibles de provocar efectos toxicológicos, si su consumo es realizado por pacientes sometidos a un tratamiento con medicamentos IMAO (considerando una ingesta razonable, del orden de 100 g y asumiendo que, tal como se indica en la bibliografía, 6 mg de tiramina pueden ya provocar esta interacción). En cuanto a las conservas de pescado estudiadas, en ningún caso se presentaron niveles de aminas biógenas que pudieran dar lugar a la citada interacción.

4.- En el contenido final de aminas biógenas en las semiconservas de anchoas cabe pensar que puedan influir:

- su posible presencia ya en la materia prima (boquerón)
- su probable formación a lo largo de la maduración de estos productos
- su eventual formación debido a una inadecuada conservación durante su vida comercial.

La última parte de nuestro trabajo ha consistido en realizar un breve estudio inicial en cuanto a la posibilidad de que se forme histamina y/o tiramina una vez se haya dado por finalizado el proceso de elaboración de las semiconservas de anchoas. Las conclusiones obtenidas al respecto fueron:

.- En productos procedentes de un mismo lote de fabricación, mantenidos a temperatura ambiente durante un periodo de 8 meses a partir de su fecha de elaboración, se ha observado que se producía un aumento importante en el contenido de histamina, transcurridos los 6 primeros meses de almacenamiento. Por el contrario, no se ha producido este aumento para la tiramina. La aparición de los niveles altos de histamina tuvo lugar, no obstante, cuando ya se había superado el periodo de vida comercial, que para estos productos es precisamente de 6 meses.

En muestras del mismo lote pero mantenidas en refrigeración durante el mismo tiempo, no se observaron aumentos en el contenido de ambas aminas a lo largo de todo el periodo de estudio.

Estos resultados corroboran la conveniencia de mantener estos productos refrigerados, recomendación que no siempre se sigue ni por los consumidores ni por parte de algunos comerciantes.

IV.- BIBLIOGRAFIA

ALMANDROS, M.E.; GIANINI, D.M.; CIARLO, A.S.; BOERI, R.L. (1986). "Formaldehyde as an interference of the 2-thiobarbituric acid test". J.Sci. Food Agric., 37: 54-58.

ANONIMO. (1965). "It's that cheese again". Food Cosmet. Toxicol., 3: 839-846.

AOAC. (1984). "Fish and other marine products". AOAC official methods of analysis, 1984,: 330-352.

BALDRATI, G.; FORNARI, M.B.; SPOTTI, E.; INCERTI, I. (1980). "Influenza delle temperature sulla formazione di istamina in pesci ad elevato contenuto di istidina libera". Industria Conserve, 55: 144-152.

BANWART, J.G. (1982). "Microbiología básica de los alimentos". 464 pp. Ed: Anthropus, Barcelona.

BARANOWSKI, J.D.; BRUST, P.A.; FRANK, H.A. (1985). "Growth of Klebsiella pneumoniae UH-2 and properties of histidine decarboxylase system in resting cells". J. Food Biochem., 9 354-360.

BERLITZ, H.D.; GROSCHE, W. (1988). "Química de los alimentos". Trad.: Escobar, E. 491-510 pp. Ed. Acribia, Zaragoza.

BLACKWELL, B; MABBIT, L.A. (1965). "Tyramine in cheese related to hypertensive crises after MAO inhibition" Lancet, May 1: 940-943.

B.O.E., no. 157: 14840-14850, 2 julio 1977. "Reglamentación Técnico Sanitaria de los productos de la pesca con destino al consumo humano". R.D. 1521/77, 3 mayo 1977.

B.O.E. , nº. 201, 22 agosto 1984. "Reglamentación Técnico Sanitaria de los establecimientos y productos de la pesca y acuicultura con destino al consumo humano". R.D. 1521/1984, 1 de agosto.

"BORDERIAS; TEJADA; JIMENEZ; MONTERO. (1987) "El músculo de pescado: conservación a bajas temperaturas". Alimentaria, mayo 1987: 25-36.

BRIGGS, D.R.; PARGETER, K.A. (1979). "Tyramine and other vasoactive amines in food". Proc. Nutr. Soc. Aut., 4: 141.

BURGESS, G.H.O.; CUTTING, C.L.; LOVERNAJA, J.,; WATERMAN. (1979). "El pescado y las industrias derivadas de la pesca". Trad.: Lopez Lorenzo, V; Barrado, M. Ed. Acribia, Zaragoza.

CABANIS, J.C. (1985). "L'histamine et sa toxicité". Bull O.I.V., 656-657: 1009-1015.

CASTELL, C.H. (1970). "Current status of the TMA test as measure of spoilage in fish". Fish. of Canadá, 22 (9): 16-22.

CASTELL, C.H.; BISHOP, D.M.; NEAL, W. (1968). "Production of trimethylamine in frozen cod muscle". J.Fish.Res.Bd.Canadá, 25 (5): 921-933.

CASTELL, C.H.; SMITH, B.; DYER, W.J.(1973). "Effects of formaldehyde on salt extractable of proteins of gadoid muscle". J. Fish. Res. Bd. Canadá, 30 (8): 1205-1231.

CASTELL; NEAL; DALE. (1973). "Comparaison of changes in trimethylamine, dimethylamine and extractable protein in iced and frozen gadoid fillets. J. Fish. Res. Bd. Canadá, 30: 1246-1248.

CATTANEO; D'AUBERT; CANTONI; GAMARASCHI; BERSANI.(1984) "Istamina e batteri istamino-producttori nelle carni". Industrie alimentari, giugno: 510-516.

CENTRO DE INSPECCION DEL COMERCIO EXTERIOR. (1986). Bases volátiles totales: método de Lucke y Geidel, modificado por Antanacopoulus". Cursillo de inspección del pescado: Vigo, marzo 1986: 37.

CHEFTEL, J.C.; CHEFTEL, H. (1980)."Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos (I)". Trad.: Lopez Capont. 65-97 pp. eD. Acribia, Zaragoza.

COGUL AREDEVOL, B. (1988) "Tiramina en pescados: contenidos y relación con el deterioro". Tesina de Licenciatura. Depto. de Ciencias Fisiológicas Humanas y de la Nutrición. Area de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

CROOK, M. (1981). "Migraine: a biochemical headache?". Biochem. Rev., 9: 351-357.

DOEGLAS, H.; HUISMAN, J.; NATER, J.(1967). "Histamine intoxication intoxication after cheese". Lancet, december 23: 1361-1362.

- GALLARDO, J.M.,; LOPEZ-BENITO, M.; PASTORIZA, L.; GONZALEZ, P.; (1979). "Determinación de bases volátiles en productos pesqueros". Inf. Tecn. Inst. Inv. Pesqu., 65: 1-17.
- GONSALVES, A.; STEWART, J.E. (1977). "Possible mechanism of action of beta-phenethylamine in migraine". J. Pharm. Pharmac., 29: 246.
- GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.L. (1986). "Bases farmacológicas de la terapéutica". Séptima edición; 1756 pp. Ed. Panamericana, México.
- GRUPO DE TOXICOLOGIA. CENTRO NACIONAL DE ALIMENTACION DE MAJADAHONDA. (1982). "Niveles de histamina en conservas de sardina y atún". Biocongrex: 243-244.
- HARDY, R; SMITH, J. (1976). "The storage of mackerel (Scomber scombrus). Development of histamine and rancidity". J. Sci. Food. Agric., 27: 595-599.
- HAWTHORN, J. (1983) "Fundamentos de la ciencia de los alimentos". Trad.: Lopez, P. 78-113. Ed. Acribia, Zaragoza
- HENRY, M. (1960). "Dosage biologique de l'istamine dans les aliments". Ann. Fals. Exp. Chim.:24-33
- HOROWITH, W. (1982) "Evaluation of analytical methods used por regulation". J.Assoc. Anal. Chem., 65 (3):525-330.
- HULTIN, H.O., (1982), "Caracteres del tejido muscular" en cap. 13 de FENNEMA, O.R., "Introducción a la ciencia de los alimentos". Trad.: De la Torre, M.C. Ed. Reverté, Barcelona.
- JANZ, I. (1985). "Untersuchungen zum histaminabbau durc lebensmittelhygienish bedentsame mikroben". Arch. exper. Vet. med., 39: 37-41.
- JANZ, I, (1985). "Untersuchungen zum einjub von temperatur, pH-wert, glukose und kochsalz auf den histaminabbau durch Pseudomonas aeruginosa". Arch. exper. Vet, med., 39: 121-127.
- JELLEFF CARR, C. (1985) "Food and drug interactions" en "Xenobiotic metabolism: nutritional effects": 221-228. ACS Symposium series, 277 American Chemical Soc. Washington.

- FERNANDEZ SALGUERO, J.; MACKIE, I.M.(1987) "Technical note: Preliminary survey of the content of histamine and other higher amines some samples of Sapanish canned fish". Int. J. Food Sci.Techn., 22: 409-412.
- FERNANDEZ-SALGUERO, J; MACKIE, I.M.(1979) "Histidine metabolism in mackerel(Scomber scombrus). Studies on histidine decarboxylase activity and histamine formation during storage of fish and liver under strile and non esterile conditions". J.Food Technol., 14: 131-139.
- FOO, L.Y.(1976) "Scombroid poisoning. Isolation and identification of saurin. J. Sci. Food. Agric., 27: 807-810.
- FORSYTHE, W.J.; REDMOND, A.(1974). "Two controlled trials of tyramine in children with migraine". Develop. Med. Child. Neurol., 16: 794-799
- FRANK, H; YOSHINAGA, D.H.(1984). "Histamine formation in tuna". ACS Symposium series 262. 443-451. Seafood toxins.
- FRANK, H.A.; BARANOWSKI, J.D.; CHONGSI RIWATANA,M; BRUST, PREMARATNE,R.J.(1985).Identification and descarboxylase activities of bacteria isolated from descomposed mahi-mahi (Coryphoena hippurus) after incubationa at o and 32° C." Int. J. Food Microbiol., 2:331-340.
- FREDERICK BOLAND, E; PAIGE DOROTHY, D.(1970). "Collaborative study of a method for the determination of trimethylamine nitrogen in fish". 84th Annual Meeting of the OACA:Oct 12-15 at Washington D.C.
- F.A.O. (1969) The FAO tech, cong. on fish. inspet. and quality control" Halifax, Canadá, July 1969. FAO Fisheries reports, 8: 15-25.
- GALLARDO, J.M.(1978). "El contenido en hipoxantina como indice del grado de frescura del pescado y de los productos pesqueros". Inf. Tecn. Inst. Inv. Pesq., 58.
- GALLARDO, J.M.; MONTEMAYOR, M.I.(1982). "Métodos generales de análisis utilizados en el exámen del pescado y productos pesqueros con referencia a su alteración". Inf. Técn. Inst. Inv. Pesq., 95.
- GALLARDO, J.M.; MONTEMAYOR, M.(1982). "Descomposición del óxido de TMA en fanera (Trisopterus Luscus L.) durante su almacenamiento en refrigeración y congelación".Inf. Tecn. Inst. Inv. Pesq., 96: 1-15.

- DYER, W.J.(1959)."Report on trimethylamine in Fish". J. of the AOAC, 42 (2): 292-294.
- DYER, W.J.; DINGLE, J.R.(1961) "Fish proteins with special reference to freezing". en cap. 9 de :GEORG BORSTROM, Fish as Food 1.
- DYER, W.J.; FRASER (1968) "Nucleotide degradation and quality in ordinary and red muscle of iced and frozen swordfish" . Fish. Res. Bd. Canadá, 23 (12).
- EDMUNDS, W.J.; EITENMILLER, R.R.(1975). "Effect of storage time temperature on histamine content and histidine decarboxylase activity of aquatic species". J. Food. Sci., 40,: 516-519.
- EDWARDS, S.T.; SANDINE, W.E. (1981)."Public health significance of amines in cheese". J. Dairy Sci., 64: 2431-2438.
- EGAN, H.; KIRK, R.S.; SAWYER, R.(1987). "Análisis químico de alimentos de Pearson". Trad: Hidalgo Mondragon, M.C. Ed. Continental S!A!, México.
- EHIRA S.; UCHIYAMA, H.(1973). "Formation of inosine and hypoxanthine in Fish muscle during storage". Bull. Tokai. Reg. Fish. Res. Lab., 75: 63-70.
- EHIRA, S.; UCHYAMA, H.(1974) "Freshness-lowering rates of cod and sea Brream viewed from changes in bacterial count. Total volatile base and TMA-N, and ATP related compounds". Bull.Japan. Soc. Sci. Fis., 40 (5): 479-487.
- EHRENBERG, A.S.C.; SHEWAN (1953). "The objective approach to sensory test of food".J. Sci. Food Agric., 4, october: 482-490.
- EITENMILLER, R.R.; DE SOUZA, S.(1984). Enzymatic mechanisms for amine formation in fish". Industrie alimentari, giugno 1984: 510-516.
- EITENMILLER, R.R.; WALLIS, J.W.; OR, R.; PHILLIPS.(1981). "Production of histidine decarboxylase and histamine by Proteus morgani". J, Food Protec., 11 (44), 815-820.
- FABER DE FREITAS, M.F.; SIGNORELI, V.L.; MOREIRA, A.(1983)."Histamina en pescado e alimentos industrializados". Col. Ital. Campinas, 13 : 123-130
- FARRERAS, P; ROZMAN, C.(1973). "Medicina interna": 282-289. Ed. Marin, S.A., Barcelona.

JONES, N.R.; MURRAY, J., (1962). "Degradation of adenine and hypoxanthine nucleotide in the muscle of chill-stored trawled cod (Gadus callarias)". J.Sci. Food.Agric, 13 : 475-480.

JONES, N.R.; MURRAY, J.; (1964). "Rapid measures of nucleotide dephosphorilation in iced fish muscle. Their value as indices of freshness and of inosine 5'-mophosphate concentration". J.Sci. Food.Agric., 15, oct: 684-690.

KAROLUS, J.J.; LEBLANC, D.H.; MARSH, A.J.; MSHAR, R; FURGAL (1985). "Presence of histamine in the bluefish Pomatomus saltatrix. J.Food Protect., 48 (2):166-168.

KIM; BJELDANES. (1979) "Amine content of toxic and wholesome canned tuna fish". J. Food Sci., 44: 922-923.

KOH, K.B.; PARK, Y.; (1982) "Studies on the histamine contents in the canned dark-fleshhood fishes". Bull. of the Koreau fisheries society, 15 (3): 191-198.

LUDORFF, W; MEYER, V.(1973) "EL pescado y los productos de la pesca". Trad.: Esain Escobar, J. Ed. Acribia, Zaragoza.

MACKIE, I.M.; FERNANDEZ, J.(1977). "Histidine metabolism in fish. Urocanic acid in mackerel (Scomber scombrus)". J.Sci. Food. Agric., 28: 935-940.

MARINE-FONT, A. (1978) "Alimentos medicamento: interacciones. Tercera parte". Circ. Farm., 35 (528):43-61.

MIETZ, J.L.; KARMAS, E. (1977) "Chemical quality index of canned tuna as determined by HPLC". J. Food. Sci. 42(1) 155-158.

MURRAY, C.K.; MURRAY, J. (1981). "Automatic histamina determinations and some new ideas on scombres toxicity". Resumen de la comunicaci3n presentada en la decimoprimer a reuni3n anual de la Western European Fish Technologist Association. Copenhagen.

NORMA UNE 55023 "Materias grasas. Indice de per3xidos".

OMURA, Y.; PICE, J.; OLCOTT, H.S. (1978) "Histamine-forming bacteria isolated from spoiled skipjack tuna and jack mackerel" J.Food Sci., 43: 1779-1781.

PALANCA, J.D.; PABLOS, M.B. (1987) "Bonito del Norte (Thunnus alalunga): grado de frescura y pH". Alimentaria: mayo 1987: 45-48.

- PAN, B.S; JAMES, D.(1985) "Histamine in marine products: production of bacteria measurement and production of formation". FAO Fish. Techn. Pap. (252): 62 pp.
- PEARSON, D. (1986) "Técnicas de laboratorio para análisis de alimentos". Trad: Romero, C.; Miranda, J.L.; Suso, J.L. 179-211 pp. Ed. Acribia, Zaragoza.
- PECHANEK, V.; WIDICK, H.; PFANNHAUSER, W.; BLAICHER, G. (1980). "Untersuchung über das vorkommen von biogenen amines lebensmitteln". Ernährung/nutrition, 4 (12): 53-61.
- PEMBERTON, C.; GASTINEAU, C. "Manual de dietética de la Clínica Mayo". Trad.: Costa, M.; Farreras, A.: 235-257. Ed. Medici, Barcelona.
- PLANAS DOMINGO, M.E. (1986) "Terapéutica de los trastornos de la afectividad". El farmacéutico, 24: 156-162.
- POTTER, N. (1973) "La ciencia de los alimentos" Trad.: Ayes. A. 46 8-483 pp. Ed.: EDUTEX, S.S., México.
- RAMANTANIS, S.; FABBENDER, C.P.; WENZER, S. (1984) "Dünnschicht chromatographische bestimmung von histamin, tyramin and triptamin in rohwürstein". Arch. Lebensmittelhyg, 35:80-82.
- RENON, P.; CATONI, C.(1979) "Ricerca di amine nelle carni di tonno fresco, refrigerato e inscatolato". Ind. Alim., maggio: 365-367.
- RIAZ, F.; BILQUIS, F., QADRI, R.B. (1981) "Inosine monophosphate and hypoxanthine as indices of quality of Shrimp (Penaeus mergensis)". J. of Food Sci., 46: 1125-1131
- RICE, S; KOEHLER, P.E. (1976). "Tyrosine and histamine descarboxylase activities of *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus* especies and the production of tyramine in fermented sausages". J.Milk Food Technol., 39 (3): 166-169.
- RIVAS, J.C.; MARINE, A. (1983) "Migrañas de origen alimentario: aspectos relacionados con la tiramina".. Circ. Farm., 278: 1-6.
- RIVAS-GONZALO, J.C. (1981) "Tiramina en vinos: análisis y evolución durante la vinificación". Tesis doctoral. Dept. Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

- ROJAS GIL, E. (1988) "Variación de calidad en pescados por los procesos de congelación". Alimentaria, marzo 1988: 53-60.
- ROJAS HIDALGO, E. (1985) "Dietética. Principios y aplicaciones":300pp. Ed. C.E.A., Madrid.
- RUIZ MARTINEZ, E.; RAMOS MARIN, M.; SANTILLANA LOPEZ, I.; MARTIN DE POZUELO ROMAY, M. (1988)."Estudio de los parámetros formaldehído y dimetilamina en merluzas y pescadillas frescas y congeladas". Alimentaria, mayo 1988: 25-30.
- RICE, S; EITENMEILLER, R.R.; KOEHLER, P.E.(1976)..Biological active amines in food: a review".J.Milk Food Technol., 39 (5): 353-358.
- SAITO, T; ARAT, K.; MATSUYOSHI, M.(1959)."A new method for estimating the freshness of fish". Bull. Japan. Soc. Sci. Fisher., 9 (24) 749-750.
- SANCHEZ, S; PLANAS, M.E.(1985)."Interacciones farmacológicas de medicamentos que actúan sobre el sistema nervioso central(I)". El farmacéutico, 18: 53-60
- SANCHINDRIAN, R. (1985). "Análisis de alimentos: métodos oficiales y recomendados por el Centro de Investigaciones y Control de Calidad". 1015 pp. Ed. Servicio de Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid.
- SANDLER, M. (1972)."Migraine: a pulmonary disease". Lancet, 1: 618-619.
- SANDLER, M.; YODIM, M.B.M.; HANINGTON, E. (1974)."A phenylethylamine oxidising defect in migraine". Nature, 250: 335-337.
- SANTOS-BUELGA, C.L. (1984). "Tiramina en productos de origen animal: análisis y relación con los procesos de maduración y deterioro". Tesis doctoral . Dpto. de Toxicología y Análisis Químico Aplicado. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.
- SANTOS, C.; MARINE, A; RIVAS, J.C. (1986)."Changes of tyramine during storage and spoilage of anchoves". J. Food. Sci., 46: 1794.
- SHEWAN, J.M. (1953). "The nitrogenous extractives from fresh fish muscle II. Comparison of several gadoids and eslamobranch species". J. Sci. Food. Agric.: 4, december.

SHEWAN, J.M.; JONES, N.R.(1957) "Chemical changes occurring in cod muscle during storage and their possible use as objective indices of quality". J.Sci.Food Agric., 8 August: 491-496.

SINNHUBER, R.D.; YU, T.C. (1977). "The 2-thiobarbituric acid reaction. An objective measure of the oxidative deterioration occurring in fats and oils."Yukagaku", 26: 259-267.

SMITH, I.; KELLOW, A.H.; HANINGTON, E.(1970) "A clinical and biochemical correlation between tyramine and migraine headache". Headache., 10 (2):43-52.

TAYLOR, S.L.(1983) "Monograph on histamine poisoning". Paper presented at the Codex Committee on Food Hygiene 19 session. Washington D.C., 26-30th, september.

TAYLOR, S.L. (1985) "Histamine poisoning associated with fish, cheese and other food". (UPH/FOS/85.1): 47pp W.H.O. Geneva.

TAYLOR, S.L. (1988) "Marine toxins of microbial origin". Food Techn., march 1988: 92-98.

TAYLOR, S.L.; GUTHERTZ, L.S.; LEATHERWOOD, M.; LIEBER, E.R. (1979) "Histamine production by Klebsiella pneumoniae and an incident of scombroid fish poisoning". Appl. Environ. Microbiol., 37 (2): 274-278.

TAYLOR, S.L.; HUI, J.Y.; LYONS, D.E. (1984) "Toxicology of scombroid poisoning". ACS Symposium series., 262: 417-430, Seafood toxins .

TEJADA, M. (1979) "Estudios sobre la desnaturalización proteica en pastas de jurel (Trachurus trachurus L.) congelados y conservados en estado congelado". Alimentaria, 108: 39 (1979); 109:115-163 (1979); 110: 25-60 (1980).

TRETHEWIE, E.R.; KHALED, L. (1972) "Wine and migrainous neuralgia". Br. Med. J., 3: 290-291.

VIDAL CAROU, M.C.; MARINE FONT, A.(1984) "Histamina en pescados y derivados. Formación y posible papel como indicación del estado de los mismos". Alimentaria, 131: 93-102.

VIDAL CAROU, M.C. (1987). "Aminas biógenas en vinos: histamina y tiramina. Análisis, contenidos y evolución" Tesis doctoral. Dpto. de Ciencias Humanas, Fisiológicas y de la Salud. Area de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

WADA, S.; TAKADA, M.; KOIZUMI, C.;(1982) "Quantitative Analisis of histamine in Marine Food Product by Gas Liquid Cromatography". Bull. Japan. Soc. Sci. Fisher., 48 (11): 1657-1661.

WATTS, D.A.; BROWN, W.D.(1982) "Histamina formation in abusively stored pacific mackerel: effect of CO₂-modified atmosphere". J. Food Sci., 47: 1386-1387.

WORTBERG, B.; ZIEPRATTI, G.; BACH, H.(1981) "Zumnachweis von histamin nebeu tyramin, putrescin un cadaverin lebensmitteln". Lebensmittelchem. Gerichtt. Chem., 35 (5): 89-82.

YAMANAKA, H.; SHIMAKURA, K.; SHIOMY, K.; KIKUCHI, T.(1986) "Changes in non-volatile amines contents of the meats of Sardines and Saury Pike during storage". Bull. of the Japan. Coc. of Sci. Fisher., 52 (1): 127-130

YAMANAKA, H.; SHIOMI, K.; NAITO, M.; KIKUCHI, T. (1980a). "Histamie content in the canned red meat fish". Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 46 (7): 905-907.

YAMANAKA, H.; SHIOMI, K.; KIKUCHI, T.; OKUZUMI, M.(1980b) "Changes in histamina contents in red meat fish, during storage at differents temperatures". Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 50 (4): 695-701.

YOSHIDA; NAKAMURA (1982) "Quantitation of histamina in fishes products by HPLC". J. Food Hyg. Soc. Japan, 23 (4): 339-343.

YOSHINAGA. D.H.; FRANK, H.A. (1982). "Histamine-producing bacteria in descomposing Skipjack tuna (Katsuwonus pelamus)". Appl. Environ. Microbiol., 2 (44): 447-452

YOUDIM, M.B.H.; BONHAM,S.; SANDLER, M.; HANINGTON, E.; WILK (1971). "Conjugation defect tyramine sensitive migraine". Nature, 230: 127-128